CHARAKTERISIERUNG VON IMMUNGLOBULINGENEN DES MENSCHEN

ZUSAMMENSETZUNG UND EVOLUTION EINER MULTIGENFAMILIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hans-Rainer Jaenichen
aus Stuttgart

München 1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0008

CHARAKTERISIERUNG VON IMMUNGLOBULINGENEN DES MENSCHEN

ZUSAMMENSETZUNG UND EVOLUTION EINER MULTIGENFAMILIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Hans-Rainer Jaenichen
aus Stuttgart

München 1984

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Schweyen
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Schmieger
Sondergutachter : Professor Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.84

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Januar 1981 bis August 1983 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau bin ich zu herzlichem Dank verpflichtet für die Stellung des Arbeitsthemas und die ausgezeichnete Betreuung. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Pech für die ständige Unterstützung und die stets offene Diskussionsbereitschaft. Meinen Kollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Teile dieser Arbeit sollen veröffentlicht werden:

H.R. Jaenichen, M. Pech, W. Lindenmaier, N. Wildgruber und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

M. Pech, H.R. Jaenichen, H.D. Pohlenz, P.S. Neumaier, G. Klobeck und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

B. Straubinger, M. Pech, K. Mühlebach, H.R. Jaenichen, H.G. Bauer und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung.....1
2. Ergebnisse
2.1. Clonierung von V_K-Genen aus einer Humangenbank...4
2.1.1. Restriktionskartierung einiger rekombinanter Phagen-DNA's.....5
2.1.2. Subclonierung der V_K-Gene für Clonierungs- und Sequenzierungsprojekte.....7
2.1.3. Restriktionskartierung von V_K-Subclonen und Fragmenten aus der Phagenbank.....12
2.2. Hybridisierung verschiedener Cosmidclone mit dem codierenden Bereich und den Flanken eines V_K-Gens.....13
2.3. Restriktionskartierung ausgewählter Cosmidclone.15
2.4. Eingehende Analyse der Phagen-Clone Ch1, Ch2, Ch3, Ch4 und der Cosmidclone cos 14, cos 52 und cos 55.....17
2.4.1. Kartierung der mit 1-3 hybridisierenden Cosmid-DNA-Regionen.....17
2.4.2. Sequenzierung von V1 und V2.....19
2.4.3. Sequenzierung von V4/1, V4/2, V14, V52 und V55.....20
3. Diskussion
3.1. Abwägung verschiedener Sequenzierungsstrategien und -techniken.....35
3.2. Sequenzvergleiche der ermittelten sieben V_K-Sequenzen des Menschen mit einer V_K-DNA Sequenz der Maus.....38
3.3. Sequenzpolymorphismen in der V_K-Sequenzfamilie..39
3.4. Abstand und Orientierung von V_K-Sequenzen.....44
3.5. Pseudogene der V_K-Sequenzfamilie.....45
3.6. Vergleiche aller bisher bekannten Aminosäure- und DNA- Sequenzen der V_KI-Subgruppe des Menschen...46

3.6.1. Identische oder ähnliche Subregionen verschiedener V_K-Gensegmente.....47
3.6.2. Polymorphismus einzelner V_K-Subregionen....52
3.6.3. Zuordnung der V_K-Sequenzen zu unterschiedlichen Sequenzfamilien.....53
3.7. Evolution der V_K-Sequenzfamilie.....54
4. Material und Methoden
4.1. Materialien
4.1.1. Chemikalien und Enzyme.....57
4.1.2. Bakterienstämme, Phagen, Plasmide und DNA's.....58
4.1.3. Phagengenbank.....59
4.1.4. Cosmidgenbanken und Cosmidclone.....59
4.1.5. Hybridisierungsproben.....59
4.2. Methoden
4.2.1. Markierung von DNA mit [α-^{32}P]-dATP und [α-^{32}P]-dCTP.....60
4.2.2. Analyse einer Ch 4A-Genbank durch Plaquehybridisierung.....60
4.2.3. DNA-Präparation aus Cosmid-, pBR-, M13- und Ch 4A-Clonen.....61
4.2.4. Analytische und präparative Agarosegele....62
4.2.5. Präparative Polyacrylamidgele.....63
4.2.6. Kartierung rekombinanter Clone mit Restriktionsnucleasen.....63
4.2.7. DNA-Transfer und -Hybridisierung.....64
4.2.8. Subclonierung isolierter DNA-Fragmente in pBR 322.....64
4.2.9. Subclonierung isolierter DNA-Fragmente in M13 mp7, mp8 und mp9.....65
4.2.10. Sequenzgele.....66
4.2.11. Autoradiogramme.....66
4.2.12. Sequenzierung
4.2.12.1. M13-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode.....67

4.2.12.2. "shotgun"-Sequenzierungsstrategie.....67
4.2.12.3. Sequenzierung nach Restriktionskarten..68
4.2.13. Computerprogramme und Datenbank.....68
4.3. Biologische Sicherheit.....69
5. Zusammenfassung.....70
6. Literaturverzeichnis.....72
7. Abkürzungsverzeichnis.....77
Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Eine wichtige Komponente des Immunsystems höherer Organismen wie Mensch und Maus sind die Antikörper oder Immunglobuline. Sie können in den Körper eingedrungene Fremdstoffe - Antigene - erkennen und unterscheiden. Antigene sind in ihrer molekularen Struktur außerordentlich verschieden. Um möglichst einen passenden Antikörper für jedes dieser Antigene zu enthalten, sollte das Antikörper-Repertoire mehr als 10^6 verschiedene Antikörpermoleküle umfassen (1). Die Variabilität des Immmunsystems ist auf die besondere Struktur der Antikörpermoleküle zurückzuführen. Die Grundeinheit eines Immunglobulinmoleküls besteht aus zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H). Bei der Sequenzanalyse zahlreicher Immunglobulinketten stellte sich heraus, daß die aminoterminalen Regionen des Moleküls variabel sind (V), während der carboxyterminale Teil in seiner Sequenz konstant ist (C) (2, 3). Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, daß die Aminosäuren des variablen Bereiches diejenigen Proteinoberflächen bilden, durch welche schließlich die Antigene gebunden werden (4, 5). Wie die genetische Information für diese große Zahl verschiedener aber dennoch verwandter Proteine im Genom niedergelegt ist, stand in den letzten Jahren im Zentrum des Interesses der Immungenetiker. Durch die Methoden der DNA-Neukombination, DNA-Sequenzierung und Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß die Immunglobuline von drei Genfamilien codiert werden, die sich bei Maus und Mensch auf jeweils drei verschiedenen Chromosomen befinden (6). Für die leichten Ketten gibt es zwei verschiedene Genfamilien, nämlich die des K- und des λ-Typs (6). Beide enthalten je drei Arten von Gensegmenten, V_L- , J_L- und C_L-Segmente (7, 8, 9). Die

schweren Ketten werden von einer Genfamilie codiert. Diese enthält die Informationen für die Ketten des μ-, δ-, γ-, α-, ε-Typs. In dieser Genfamilie gibt es im Gegensatz zu den leichten Ketten vier Arten von Gensegmenten: V_H, D, J_H und C_H (6, 10). Daraus folgt, daß weder die leichten noch die schweren Ketten durchgehend codiert sind.

Die genannten Segmente werden erst im Zuge der B-Lymphocyten-Differenzierung so umgelagert, daß durch nachfolgende Transkription, RNA-Spleißen, Translation und Assoziation der prozessierten Proteine funktionelle Immunglobulinmoleküle gebildet werden können. Ein Umlagerungsprozess betrifft zunächst die V_H-, D-, J_H- und C_H-Segmente und dann die V_L-, J_L- und C_L-Segmente (1, 6, 11, 12, 13). Eine B-Zelle, die immer zuerst IgM Moleküle produziert, kann auf die Expression anderer Typen von schweren Ketten umschalten (z.B. IgG oder IgA). Hierbei wird in einer zweiten Art von Umlagerung das C_μ-Segment durch ein anderes C_H-Segment ersetzt (14). Serologische Untersuchungen bei Mensch und Maus ergaben, daß die leichten Ketten des K-Typs und die des λ-Typs in unterschiedlicher Häufigkeit im Serum vorliegen (5), beim Menschen sind 70% der L-Ketten vom K-Typ, bei der Maus 95%. Der Vergleich von etwa 150 K-Myelomproteinsequenzen zeigte, daß V_K-Sequenzen des Menschen in vier Subgruppen unterteilt werden können (2, 3, 15). Beim Menschen gibt es im Vergleich zur Maus wahrscheinlich eine deutlich geringere Zahl von K-Gensegmenten (16, 17). Wenn man alle Mitglieder einer V_K-Gensegmentfamilie clonieren möchte, ist es deshalb günstiger, für solche Clonierungsexperimente die V_K-Gensegmentfamilie des Menschen auszuwählen. Damit könnten Fragen beantwortet werden, die die Anzahl der V_K-Gensegmente, den Abstand der V_K-Gensegmente und die

Orientierung der Gensegmente zueinander, die Anordnung der Mitglieder, die für die unterschiedlichen Subgruppen codieren und den Anteil der Pseudogene im V_K-Gensegmentcluster betreffen. Aus den Einzelergebnissen würden sich Modelle für die Evolution der V_K-Genfamilie ableiten lassen.

Um diese Fragen durch die Clonierung menschlicher V_K-Gene beantworten zu können, mußte zunächst mindestens ein menschliches V_K-Gen cloniert werden. Dazu wurde ein bereits sequenziertes Maus-V_K-Gensegment verwendet. Mit diesem Gensegment als Hybridisierungs-Probe sollte zuerst in einer menschlichen Genbank nach V_K-Gensegmenten gesucht werden, die aus Fragmenten von Bakteriophagen sowie aus der DNA der Leber eines Foetus konstruiert worden war (18). Nach der Charakterisierung der gefundenen Clone sollten neue Hybridisierungs-Proben konstruiert werden, mit denen dann in verschiedenen menschlichen Genbanken V_K-Gensegmente gesucht werden sollten. Diese Genbanken waren mit Cosmiden als Vektoren konstruiert worden, da hierbei große DNA-Fragmente (bis 45 kb) cloniert werden können. Im Rahmen der Arbeitsgruppe sollten ausgewählte rekombinante Cosmide durch Restriktionskartierung charakterisiert werden. Die Sequenz einiger V_K-Gensegmente aus rekombinanten Phagen- und Cosmidclonen sollte zur Lösung folgender Fragestellungen beitragen: Welchen Abstand voneinander und welche Orientierung zueinander haben die V_K-Gene? Wieviele der analysierten V_K-Sequenzen können nach einer Umlagerung für die variablen Regionen der leichten Kette vom K-Typ codieren? Welcher Subgruppe gehören die analysierten Gene an? Welche Sequenzhomologien bestehen in den bisher bekannten menschlichen V_K-Sequenzen? Können aus dem Muster der Sequenzhomologien Aussagen zur Evolution der Familie der V_K-Gensegmente abgeleitet werden?

2. ERGEBNISSE

2.1 Clonierung von V_K-Gensegmenten aus einer Humangenbank

Zunächst sollte mindestens ein V_K-Gensegment aus menschlicher DNA isoliert werden. Hierfür wurde eine Phagengenbank benützt, die von H. Lawn et al. (18) aus menschlicher, foetaler Leber-DNA mit Hilfe des λ-Phagen Charon 4A (Ch 4A) konstruiert worden war. Als DNA-Probe sollte ein cloniertes V_K-Gensegment benützt werden, das aus Mausleber-DNA isoliert worden war. Die rekombinanten Phagenclone aus der Phagengenbank sollten charakterisiert und dazu verwendet werden, neue DNA-Proben zu konstruieren. Die Vermutung, mit dieser DNA-Probe auf diese Weise menschliche V_K-Gensegmente zu finden, beruhte auf Homologievergleichen zwischen dem Maus-V_K-Gensegment L6 (Abbildung 1) (19, 20) und den von Kabat et al. (2) beschriebenen Aminosäuresequenzen menschlicher V_K-Proteine, die mit Hilfe eines Computers durchgeführt wurden. Die höchste Homologie bestand dabei zwischen L6 und der menschlichen V_K-Subgruppe I (56,4 %).

Um in der verwendeten Phagengenbank ein Gen, das im Genom in einer Kopie vorkommt, mit 95%iger Wahrscheinlichkeit zu finden, sollte die DNA von etwa $8x10^5$ rekombinanten Phagen mit der DNA-Probe L6/2 (Abbildung 1) hybridisiert werden. Wie in 4.2.2. beschrieben, wurden im vorliegenden Fall $2x10^6$ Phagen getestet. Bei der ersten Hybridisierung (4.2.7.) ergaben sich 21 Hybridisierungssignale. Die entsprechenden rekombinanten Phagen wurden durch zwei weitere Ausplattierungen (4.2.2.) und Hybridisierungen (4.2.7.) geprüft. Zuletzt konnten insgesamt neun rekombinante Phagen nachgewiesen werden, deren DNA bei der Hybridisierung mit der Probe

L6/2 ein eindeutig positives Signal ergab. Zur weiteren Analyse wurden die Phagen Ch 1, Ch 2, Ch 3 und Ch 4 ausgewählt, deren DNA bei der letzten Hybridisierung mit L6/2 die stärksten Signale zeigte.

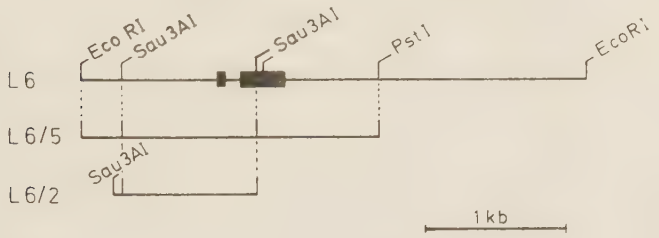


Abbildung 1: Partielle Restriktionskarte von L6 und den pBR 322 Subclonen L6/2 und L6/5 (nach 20)

L6 ist ein 3,4 kb Eco RI-Fragment aus Maus-Leber-DNA, das in λgtWES cloniert wurde. Im 990 bp langen pBR 322-Subclon L6/2 ist am 5'-Ende noch ein 55 bp langes Sau 3AI-Fragment eingebaut, das aus dem V-Gen-Bereich stammt. Der pBR Subclon L6/5 beeinhaltet ein 2070 bp langes Eco R I-Pst I- Fragment . Der Subclon L6/2 enthält die gesamte Signalpeptid-Sequenz sowie einen Teil der V-Gensegment-Sequenz bis einschließlich Aminosäureposition 48. Im Subclon L6/5 sind sowohl die gesamte Signalpeptid-Sequenz als auch die gesamte V-Gensegment-Sequenz enthalten.

2.1.1. Restriktionskartierung einiger rekombinanter Phagen-DNA's

Die vier ausgewählten Clone sollten durch Spaltungen mit Restriktionsnukleasen kartiert werden. Nachdem die gespaltene DNA, wie in 4.2.7. beschrieben, aus dem Agarosegel auf Nitrocellulosefilter übertragen worden war,

sollten die so angefertigten Southern-Filter (4.2.7.) mit dem Maus-DNA-Fragment L6/5 (Abbildung 1) (20) sowie mit Placenta-DNA hybridisiert werden. Damit sollten einerseits Bereiche, die ein V_K-Gensegment tragen, und andererseits repetitive Bereiche festgelegt werden. Für die Kartierung der Charon-Clone wurden die Nucleasen Bam HI, Bgl II, Cla I, Eco RI, Kpn I, Nru I, Pvu I, Sac II, Sal I, Sma I, Xba I und Xho I eingesetzt. Mit Hilfe bekannter Restriktionskarten für die Nucleasen Bam HI, Bgl II, Eco RI, Kpn I, Sal I, Xba I und Xho I wurden zunächst zusätzliche Spaltstellen der anderen oben genannten Restriktionsnucleasen in der Phagen-DNA bestimmt, da diese zum damaligen Zeitpunkt noch nicht bekannt waren. Daraufhin wurden die aus der Phagengenbank isolierten Clone mit allen genannten Enzymen in Ansätzen zu je 1µg DNA mit einem oder zwei Enzymen gleichzeitig gespalten (siehe 4.2.6.). Die Spaltprodukte wurden wie in 4.2.4. beschrieben auf einem analytischen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Nach Übertragung der DNA auf Nitrocellulosefilter wurden diese zunächst mit L6/5 (Abbildung 1) hybridisiert und dann erneut in einem zweiten, nachfolgenden Hybridisierungsschritt mit menschlicher Placenta-DNA (4.2.7.). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde auf den Gelen jeweils eine Reihe von Markergemischen, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthielten, aufgetrennt. Abbildung 2 zeigt je ein Beispiel einer Restriktionsspaltung und einer Hybridisierung mit L6/5- und Placenta-DNA. Auf Grund der Laufstrecke der DNA-Fragmente bekannter Größe in den jeweiligen Agarosegelen konnte auf halblogarithmischem Papier eine Eichgerade angefertigt werden, aus der die fraglichen Fragmentgrößen abgelesen werden konnten. Auf diese Weise war es möglich, wie in Abbildung 3 gezeigte Restriktionskarten zu erstellen. Durch die Filterhybridisierungen konnte bestimmten Banden eine Homo-

logie zur jeweils verwendeten Hybridisierungsprobe zugeordnet werden (Abbildung 3). Aus den Restriktionskarten (Abbildung 3) geht hervor, daß die vier untersuchten rekombinanten Phagenclone 13,0 bis 15,6 kb lange Insertionen menschlicher DNA enthalten.

2.1.2. Subclonierung der V_K-Gensegmente für Clonierungs- und Sequenzierungsprojekte

Für die Suche in den in 4.1.4. beschriebenen Cosmidgenbanken wurden verschiedene Hybridisierungsproben konstruiert. Zunächst wurden die mit L6/5 hybridisierenden Bereiche der Phagenclone Ch 1, Ch 2 und Ch 3 cloniert. Ein 3,5 kb langes Bam HI-Fragment aus Ch 1 wurde in M13 mp7 subcloniert (Subclon 1-1) (Abbildung 3, Tabelle 2), ebenso wurde ein 4,1 kb großes Bam HI -Fragment aus Ch 2 in M13 mp7 ligiert (Subclon 2-1) (Abbildung 3, Tabelle 2) (4.2.9.). Das 1,95 kb lange Bgl II/Eco RI-Fragment aus Ch 3 dagegen wurde in pBR322 cloniert (Subclon 3-1) (Abbildung 3) (4.2.8.). Wie in 2.1.3. beschrieben wird, wurden darüber hinaus, nachdem erste Sequenzdaten aus Ch 1 vorlagen, ausgehend vom Subclon 1-1 die Subclone 1-2 (470 bp Pst I -Fragment, 3'-Flanke von V1), 1-3 (560 bp Pst I-Fragment, Signalpeptid und codierender Bereich für die Aminosäuren 1 bis 78 von V1) und 1-4 (880 bp Pst I-Fragment, codierender Bereich von Aminosäure 79 bis 95 und 3'-Flanke von V1) konstruiert (Tabelle 2).

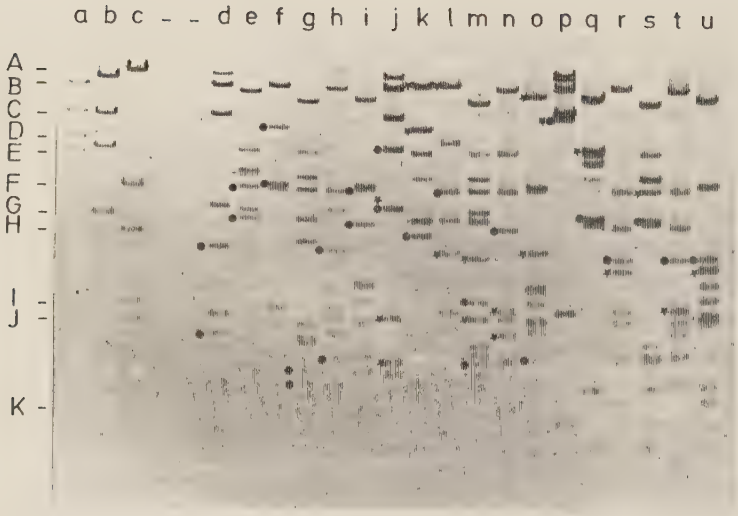


Abbildung 2 A

Abbildung 2 B

Abbildung 2 C

Abbildung 2: Restriktionsspaltungen der Charon-Clone Ch 1, Ch 2 und Ch 4 und die Autoradiogramme der Hybridisierungen mit dem Fragment L6/5 und mit Placenta-DNA.

Bild A: Mit Hilfe einer Eco RI-, einer Bam HI- und einer Bgl II-Spaltung (aufgetragen in den Bahnen a, b, c,) wurden aus Charon 4A-DNA Banden bekannter Größe (21) generiert. Mit Hilfe dieser Banden als Markerbanden konnten die Größen der in den Bahnen d bis u auftretenden Banden bestimmt werden. Die einzelnen Markerbandengrößen sind: A = 32131, B = 19801, C = 10459, D = 7813, E = 6892, F = 4857, G = 3928, H = 3324, I = 2155, J = 1796, K = 651.
Die Bahnen d bis u enthalten Einzel- und Doppelspaltungen der Clone Ch 4, Ch 1 und Ch 2. Die folgende Serie von Spaltungen wiederholt sich dreimal: Eco RI, Bam HI, Bgl II, Eco RI/Bam HI, Eco RI/Bgl II, Bam HI/Bgl II.
Bild B zeigt das zugehörige Autoradiogramm der Hybridisierung mit L6/5 und Bild C das der Hybridisierung mit Placenta-DNA.
Die Banden, die mit L6/5 hybridisieren, sind in Bild A durch Punkte gekennzeichnet, die mit Placenta-DNA hybridisierenden Banden durch Sternchen.

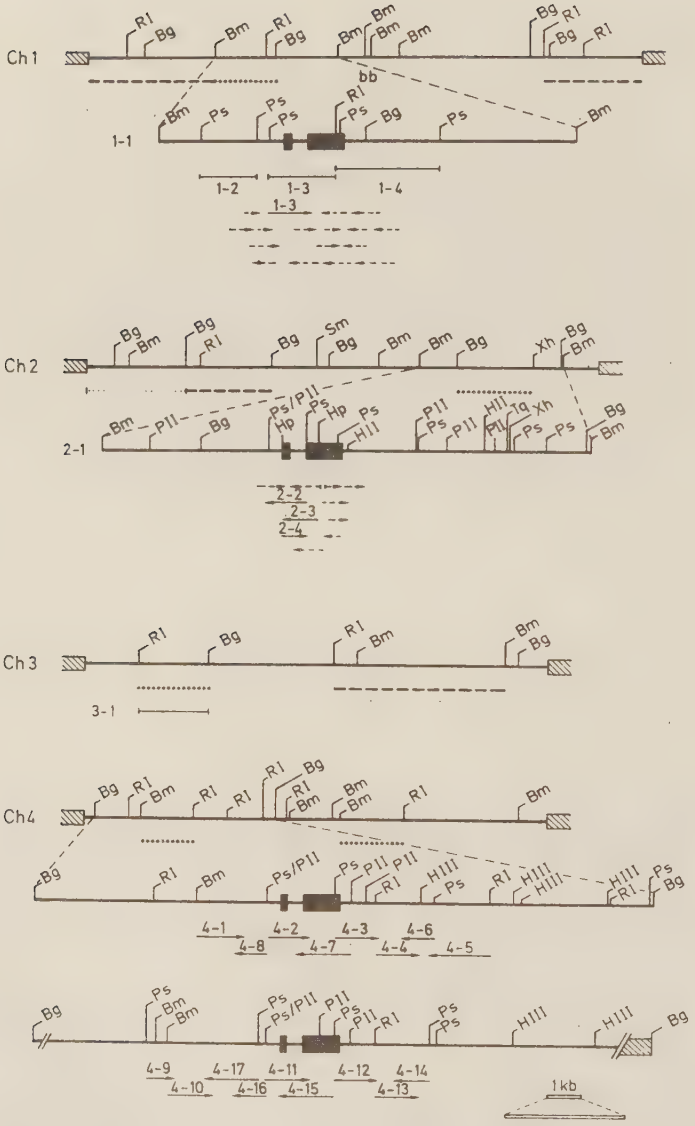

Ch1
R1
Bg
Bm
bb
Ps
1-1
1-2
1-3
1-4
Ch2
Sm
Xh
Pl1
Ps/Pl1
Hp
Hl1
Tq
2-1
2-2
2-3
2-4
Ch3
3-1
Ch4
Hl11
4-1
4-2
4-3
4-4
4-5
4-6
4-7
4-8
4-9
4-10
4-11
4-12
4-13
4-14
4-15
4-16
4-17
1 kb

Abbildung 3

Abbildung 3: Restriktionskarten der Clone Ch 1, Ch 2, Ch 3 und Ch 4 sowie der Hybridisierungsclone von Ch 1, Ch 2 und Ch 3; Sequenzierstrategie der V-Segment-tragenden Bereiche von Ch 1, Ch 2 und Ch 4.

Dargestellt sind die Restriktionskarten der Clone Ch 1, Ch 2, Ch 3 und Ch 4. Für die Kennzeichnung der Enzyme wurden folgende Abkürzungen verwendet: Ac, Acc I; Bm, Bam HI; Bl, Bal I; Bg, Bgl II; R I, Eco RI; H II, Hinc II; H III, Hind III; Hp, Hpa II; Nr, Nru I; P II, Pvu II; Ps, Pst I, Sl, Sal I, Sm, Sma I, Tq, Taq I und Xh, Xho I. In der Karte von Ch 2 und Ch 3 ist jeweils ein Bereich durch Punkte gekennzeichnet. Dies bedeutet, daß in diesem Bereich bei Ch 2 zwei Bgl II- und zwei Eco RI-Spaltstellen und bei Ch 3 zwei Bam HI-Spaltstellen nicht eindeutig festgelegt werden konnten. In der Karte von Ch 1 ist entweder die eine oder die andere der mit b gekennzeichneten Bam HI-Spaltstellen vorhanden. Die schraffierten Balken symbolisieren die Charon-Vektor-DNA, die geschlossenen Balken die V-Gensegmente. Die mit L6/5 hybridisierenden Bereiche sind durch Sternchen, die mit Placenta-DNA hybridisierenden Bereiche durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die detaillierter kartierten Bereiche der Clone Ch 1, Ch 2, Ch 4 sind vergrößert dargestellt. Dabei sind diese Karten so angeordnet, daß die V-Gensegmente genau übereinander liegen. Dadurch wird ein Vergleich dieser Karten untereinander erleichtert. Das Bgl II-Fragment von Ch 4, auf dem das zweite V-Gensegment (V4B) liegt, ist nicht vollständig dargestellt, was durch die unterbrochenen Linien symbolisiert wird. Als Hybridisierungsclone wurden die Clone 1-1, 1-2, 1-3, 2-1 und 3-1 konstruiert. Die Pfeile kennzeichnen die Richtung (5' nach 3') und die Länge der sequenzierten DNA-Stränge, wobei die zugehörigen Nummern auf die jeweiligen Clone hinweisen (Tabelle 2). Die mit gestrichelten Linien gezeichneten Clone wurden aus durch Beschallung generierten DNA-Fragmenten hergestellt, die mit nicht unterbrochenen Linien gezeichneten Clone wurden durch Clonierung von Restriktionsfragmenten gewonnen.

2.1.3. Restriktionskartierung von V_K-Subclonen und Fragmenten aus der Phagengenbank

Da die Gene V1, V2, V4A und V4B sequenziert werden sollten, wurde von diesen und den sie umgebenden DNA-Bereichen zunächst eine genauere Restriktionskarte angefertigt. Bei dieser Kartierung wurden im Falle von V1 und V2 die bereits in 2.1.2. beschriebenen Subclone 1-1 und 2-1 bearbeitet. Alle Nucleasen wurden so ausgewählt, daß die bei der Spaltung entstehenden Enden bei einer Clonierung in die Vektormoleküle M13 mp7, M13 mp8, M13 mp9 ligiert werden konnten. Als erstes wurde der Clon 1-1 mit Pst I, Eco RI und Bgl II gespalten, um die zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannten Pst I-Spaltstellen festzulegen. Da bereits eine Teilsequenz (2.4.2.) erstellt worden war, war es möglich die 470, 560 und 880 bp langen Pst I-Fragmente, wie in 2.1.2. beschrieben, der V-Gensegmentregion und ihren Flanken zuzuordnen (Abbildung 3). Nach dem Clon 1-1 wurde der Ch 2 Subclon 2-1 kartiert. Die dazu verwendeten Enzyme waren Hinc II, Hpa II, Pst I, Pvu II und Taq I. Da der M13 mp7-Vektor mehrere Hpa II-, Pvu II- und Taq I-Spaltstellen enthält, wurden zuerst 30 µg des eingebauten 3,8 kb Human-DNA-Fragments, wie in 4.2.4. beschrieben, isoliert. Mit der auf diese Weise erhaltenen Fragment-DNA wurden die Kartierungsspaltungen ausgeführt. In der Restriktionskarte von 2-1 konnte durch Hybridisierung der zugehörigen Southern-Filter mit dem Subclon 1-3 der V-Gensegmentbereich auf ein 270 sowie ein 330 bp langes Pst I-Fragment eingegrenzt werden (Abbildung 3).
Für die Kartierung der Gene V4A und V4B wurden durch präparative Spaltungen mit Bgl II (4.2.4.) zunächst jeweils 10 µg der 5,1 und 9,1 kb langen, mit L6/5 hybridisierenden Bgl II-Fragmente isoliert (Abbildung

3). Die Restriktionskarten dieser Fragmente wurden zusätzlich für die Enzyme Hind III, Pst I und Pvu II erstellt. Mit der Probe 1-3 wurde für V4A und V4B ein jeweils 560 bp großer V-Gensegmentbereich eingegrenzt.

2.2. Hybridisierung verschiedener Cosmidclone mit dem codierenen Bereich und den Flanken eines V_K-Gensegments

Nachdem inzwischen die Clone 1-2, 1-3 und 1-4 konstruiert worden waren, sollten alle durch die Arbeitsgruppe charakterisierten Cosmidclone und alle Charon-Clone mit diesen hybridisiert werden. Dies wurde durchgeführt, um innerhalb der Clone verschiedene Untergruppen gegeneinander abzugrenzen, die mit den DNA-Proben für den Flanken- und V-Gensegmentbereich unterschiedliche Signalstärken im Hybridisierungsexperiment aufweisen. Dazu wurde jeweils 1 µg rekombinante DNA jedes Clones mit Bgl II gespalten, und nach Gelelektrophorese sowie Southern-Transfer (4.2.4. und 4.2.7.) wurden die entsprechenden Nitrocellulosefilter gegen die V1-Subclone hybridisiert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Hybridisierungen zeigt Tabelle 1. Als besonderes Resultat ergab sich, daß obwohl alle Clone mit 1-1 isoliert wurden, nicht alle Clone mit den Subclonen von 1-1 (d.h. 1-2, 1-3, 1-4) hybridisierten. Dieser zunächst überraschende Sachverhalt wurde schließlich durch B. Straubinger (22) aufgeklärt.

Aufgrund dieses Hybridisierungsversuchs wurden die Clone cos 14, cos 52 und cos 55 für die Sequenzanalyse ausgewählt (2.4.3.). Alle drei Clone hatten bei der Hybridisierung eine starke Homologie zu 1-3 und damit zu dem eigentlichen V-Gensegmentbereich von V1 gezeigt.

Ch/cos	Hybridisierung mit				cos	Hybridisierung mit			
	1-1	1-2	1-3	1-4		1-1	1-2	1-3	1-4
Ch 1	++	++	++	++	cos 22	++	+	+	++
Ch 2	++	?	+	++	cos 23	+		-	-
Ch 3	++	-	+	+	cos 24	+	-	-	?
Ch 4	++	?	+	+	cos 25	++	-	-	?
cos 10	++				cos 26	+	-	-	?
cos 11	+				cos 27	+	-	-	?
cos 12	++	-	+	+	cos 28	?	-	-	-
cos 13	++	+	+	+	cos 31	+	-	-	-
cos 14	++	-	+	++	cos 50	++	+	+	++
cos 15	+	-	-	?	cos 51	++	+	+	+
cos 16	++		+	+	cos 52	++	?	+	++
cos 17	++	-	+	+	cos 53	+	-	-	-
cos 18	+	-	-	?	cos 54	++	+	+	+
cos 19	++	+	+	?	cos 55	+	?	+	+
cos 20	+	-	-	?	cos 56	+	-	-	-
cos 21	++	+	+	++	cos 59	++	-	-	-

Tabelle 1: Ergebnisse der Hybridisierung aller Charon- und Cosmidclone mit den Subclonen 1-1, 1-2, 1-3 und 1-4 aus Ch 1.

Bedeutung der Symbole: ++ = sehr starkes Signal, + = starkes Signal, ? = sehr schwaches Signal b.z.w. fragliches Signal, kein Symbol = nicht getestet, - = kein Signal.

2.3.Restriktionskartierung ausgewählter Cosmidclone

Von M. Pech waren aus den in 4.1.4. beschriebenen Cosmidgenbanken mit Hilfe der DNA-Probe 1-1 (Abbildung 3) insgesamt 28 verschiedene rekombinante Clone isoliert worden. Davon wurden die Clone cos 24, cos 31, cos 50, cos 51, cos 52 und cos 55 mit den Restriktionsnucleasen Cla I, Kpn I, Nru I, Sac II, Sal I, Sma I, Pvu I und Xho I kartiert. Diese Nucleasen, die auch schon für die Kartierung der Charon-Clone eingesetzt worden waren (2.1.1.), wurden ursprünglich besonders im Hinblick auf die Kartierung von Cosmidclonen ausgewählt . Dabei wurde davon ausgegangen, daß Nucleasen, die die Nucleotidabfolge CpG in ihrer Erkennungssequenz enthalten, eukaryontische DNA relativ selten spalten. Bei einer möglichen Insertionsgröße von etwa 40 kb ist es damit wahrscheinlich, daß eine Anzahl von Restriktionsfragmenten generiert wird, die für eine Kartierung geeignet ist. Die Kartierung wurde, wie in 2.1.1. beschrieben, durchgeführt. Als Hybridisierungsprobe wurde der Ch 1-Subclon 1-1 verwendet. Die auf diese Weise erstellten Karten werden in Abbildung 4 vorgestellt. Mit Hilfe der Kartierung wurde festgestellt, daß die Cosmidclone cos 24, cos 31, cos 50, cos 52 und cos 55 jeweils zwei Vektormoleküle enthalten (Abbildung 4). Bei der Kartierung der weiteren 22 Cosmidclone durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe stellte sich heraus, daß ein großer Teil aller vorliegenden Clone diesen konstruktionsmethodisch bedingten Mangel aufweisen.

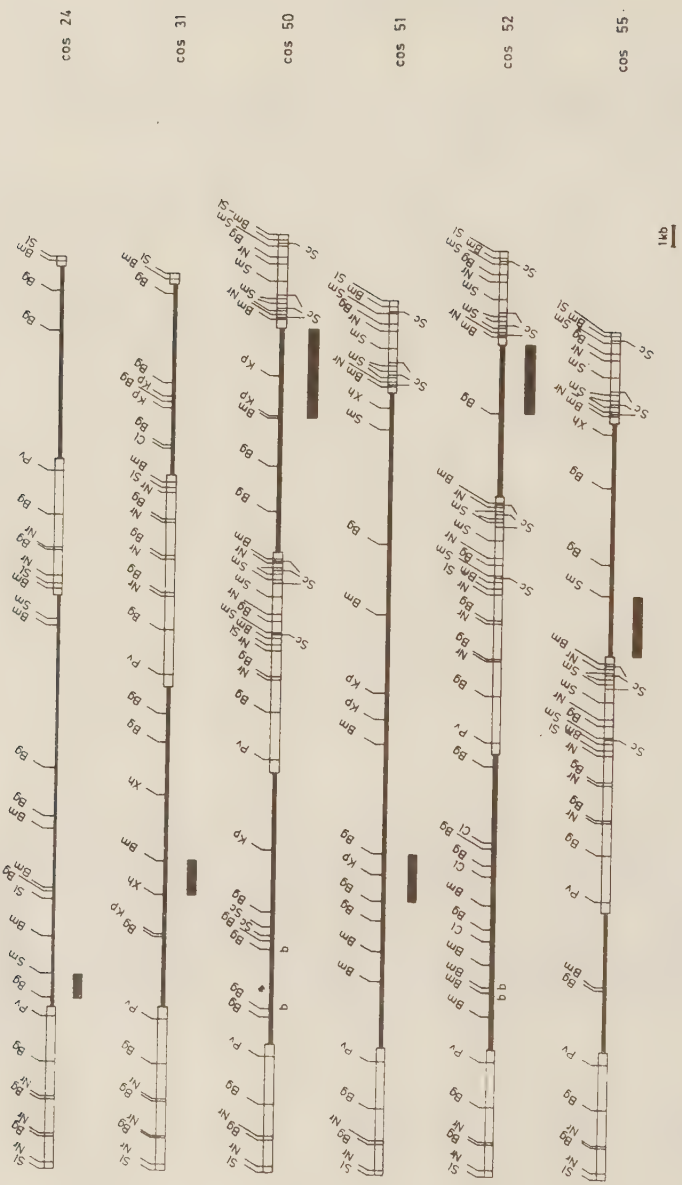



Abbildung 4

Abbildung 4: Kartierung der Cosmidclone cos 24, cos 31, cos 50, cos 51, cos 52 und cos 55

Dargestellt sind die Restriktionskarten der Cosmidclone cos 24, cos 31, cos 50, cos 51, cos 52 und cos 55. Für die Kennzeichnung der Enzyme wurden dieselben Abkürzungen verwendet wie in Abbildung 3. Die geschlossenen Balken kennzeichnen die mit 1-1 (Abbildung 3) hybridisierenden Bereiche.

2.4. Eingehende Analyse der Phagen-Clone Ch 1, Ch 2, Ch 3, Ch 4 und der Cosmidclone cos 14, cos 52 und cos 55

2.4.1. Kartierung der mit 1-3 hybridisierenden Cosmid-DNA-Regionen

Da auch die V_K-Gensegmente der Cosmidclone cos 14, cos 52 und cos 55 sequenziert werden sollten, wurden auch hier zunächst genauere Restriktionskarten erstellt. Auch bei diesen Kartierungen wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, die eine Fragmentclonierung in M13-Vektoren erlauben.
Vor der Kartierung wurde DNA der drei Clone isoliert. Aus diesen DNA's wurden für die Kartierung der Clone die folgenden Fragmente wie in 4.2.4. beschrieben isoliert: cos 14: 3,3 kb Bgl II-Fragment, cos 52: 3,7 kb Bgl II/ Bam HI-Fragment, und cos 55: 4,6 kb Bgl II/ Bam HI-Fragment. Bei der Auswahl der zu kartierenden Fragmente wurde neben den Hybridisierungsergebnissen auch die Anordnung fragmentinterner Spaltstellen berücksichtigt. Im isolierten Fragment von cos 14 liegt eine Xho I-Spaltstelle und im isolierten Fragment von cos 55 liegt eine Sma I-Spaltstelle, die die relative Orientierung zum Cosmidclon angibt. Beim Clon cos 55 wurde die relative Orientierung des Fragments zum Cosmid durch

eine Hybridisierung mit pBR322-DNA und durch den Vergleich kartierter Spaltstellen mit in pBR322 bekannten Spaltstellen (Hpa II und Taq I) festgelegt. Dies war möglich, weil der Cosmidvektor pHC 79/2 auch die gesamte pBR 322-Sequenz enthält. Die Fragmente der Cosmidinsertionen wurden mit den folgenden Enzymen nach der in 2.1.3. beschriebenen Methode kartiert: cos 14 mit Hinc II, Hpa II, Pst I, Pvu II und Xho I (Abbildung 5), cos 52 mit Hind III, Hpa II, Pst I und Pvu II (Abbildung 5) und cos 55 mit Acc I, Bal I, Hind III, Hpa II, Pst I, Pvu II, Sma I und Taq I (Abbildung 5). Der Bereich, der das V-Gensegment trägt, wurde bei der Kartierung durch Verwendung von 1-3 zur Hybridisierung der entsprechenden Southern-Filter soweit als möglich eingegrenzt.

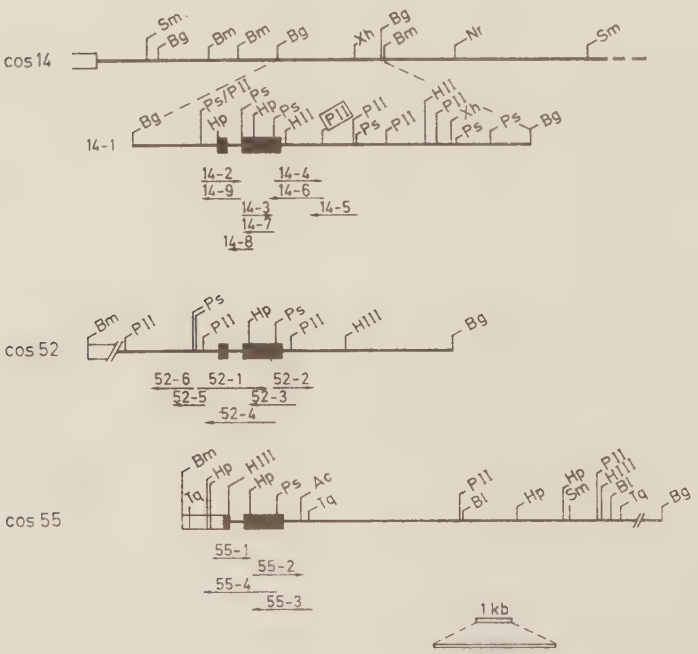


Abbildung 5

Abbildung 5: Kartierung von Fragmenten aus den Clonen cos 14, cos 52 und cos 55, die mit dem Ch 1 Subclon 1-3 hybridisieren und Sequenzierstrategien der enthaltenen V-Gensegmente.

Dargestellt sind Restriktionskarten von Fragmenten der Cosmidclone cos 14, cos 52 und cos 55. Von cos 14 wird außerdem ein Teil der Übersichtskarte gezeigt, die Übersichtskarten von cos 52 und cos 55 sind bereits in Abbildung 4 vorgestellt worden. Die Kennzeichnung der Enzyme und die der Pfeile in den Sequenzierstrategien wurden wie in Abbildung 3 gewählt.

2.4.2. Sequenzierung von V1 und V2

Die ersten Sequenzen der Clone V1 und V2 wurden durch die Anwendung einer Modifikation der Methode von Anderson (23) (4.2.12.2.) erstellt. Durch Sequenzierung (4.2.12.1.) ergaben sich die in Abbildung 3 in der Sequenzierstrategie von V1 und V2 mit gestrichelten Linien gekennzeichneten Sequenzen. Nachdem von diesen beiden V-Genen die nach 4.2.12.2. konstruierten M13 mp7-Clone sequenziert worden waren, zeigte sich, daß in beiden Fällen die für das Signalpeptid codierende DNA-Region fehlte und in anderen V-Gensegmentbereichen erheblich redundante Information vorlag. Die bis dahin vorliegenden Sequenzergebnisse waren jedoch ausreichend für die genaue Festlegung des V-Gensegments in der in 2.1.3. beschriebenen Restriktionskarte von V1. Mit Hilfe dieser Kenntnisse war es schließlich möglich die bereits in 2.1.2. detailliert beschriebenen V1-Subclone 1-2, 1-3 und 1-4 zu konstruieren.

2.4.3. Sequenzierung von V4A, V4B, V14, V52 und V55

Als diese Sequenzierungsprojekte durchgeführt wurden, war bereits die Sequenzgel-Technik von W. Ansorge etabliert (pers. Mitteilung, 24, 25, 26). Außerdem kamen zu diesem Zeitpunkt bereits Reaktionsgemische zum Einsatz, die ein anderes Desoxy- zu Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphat-Verhältnis aufweisen (N. Gough, pers. Mitteilung). Die Kombination dieser beiden neuen Methoden ermöglichte es DNA-Sequenzen von Fragmenten einer Länge bis zu etwa 600 bp zu bestimmen. Inzwischen waren die neuen M 13-Vektoren M13 mp8 und M13 mp9 erhältlich, wodurch sich weitere Möglichkeiten der Clonierung und Sequenzierung bestimmter Restriktionsfragmente ergaben.

Aufgrund dessen wurde beschlossen die Sequenzen der restlichen Bereiche von V1 und V2 und die Sequenzen der V-Gensegmente V4A, V4B, V14, V52 und V55 mit Hilfe geeigneter Subclone zu erstellen (Tabelle 2). Diese Subclone wurden in Anlehnung an die in 2.1.3. und 2.4.1. gezeigten, detaillierten Restriktionskarten konstruiert. Sie sind in den Sequenzierstrategien aller V-Gensegmente mit durchgehenden Linien gekennzeichnet (Abbildung 3 und Abbildung 5).

Die durch die einzelnen Sequenzreaktionen erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe eines Computers ausgewertet (4.2.13.) und mit diesem zu den in den Abbildungen 6 bis 12 vorgestellten DNA-Sequenzen zusammengesetzt. Die TATA-Signalsequenz und die beiden Signalsequenzen für die V-J-Umlagerung sind in diesen Abbildungen wie in den Referenzen 27 und 28 beschrieben eingezeichnet. Durch ein weiteres Computerprogramm (4.2.13.) wurden die potentiellen b.z.w. formalen Translationsprodukte (zur genaueren Erläuterung siehe 3.6.) ermittelt. Die Start- und Endpunkte des Signal-

Charon Clon b.z.w. Cosmid	Clonbezeichnung	Restriktionsenden des Fragments 5'	3'	Fragmentgröße bp	Vektor (M13) +Spaltenzym.
Ch1	1-1	BamHI	BamHI	3500	mp7(BamHI)
	1-2	Pst I	Pst I	470	mp7(Pst I)
	1-3	Pst I	Pst I	560	mp7(Pst I)
	1-4	Pst I	Pst I	880	mp7(Pst I)
Ch2	2-1	BamHI	BamHI	4100	mp7(BamHI)
	2-2	Pst I	Pst I	310	mp8(Pst I)
	2-3	HpaII	HpaII	290	mp7(Acc I)
	2-4	HpaII	HpaII	290	mp7(Acc I)
CH4	4-1	BamHI	Pst I	620	mp9(PstI/BamHI)
	4-2	PvuII	PvuII	660	mp8(Sma I)
	4-3	Pst I	Pst I	820	mp8(Pst I)
	4-4	EcoRI	EcoRI	960	mp8(EcoRI)
	4-5	EcoRI	EcoRI	960	mp8(EcoRI)
	4-6	Pst I	Pst I	820	mp8(Pst I)
	4-7	PvuII	PvuII	660	mp8(Sma I)
	4-8	Pst I	BamHI	620	mp8(PstI/BamHI)
	4-9	Pst I	Pst I	960	mp8(Pst I)
	4-10	BamHI	PvuII	880	mp8(SmaI/BamHI)
	4-11	Pst I	Pst I	560	mp8(Pst I)
	4-12	Pst I	Pst I	780	mp8(Pst I)
	4-13	EcoRI	HindIII	1160	mp9(EcoRI/HindIII)
	4-14	Pst I	Pst I	780	mp8(Pst I)
	4-15	Pst I	Pst I	560	mp8(Pst I)
	4-16	PvuII	BamHI	880	mp9(SmaI/BamHI)
	4-17	Pst I	Pst I	960	mp8(Pst I)
cos14	14-1	BglII	BglII	3280	mp9(BamHI)
	14-2	Pst I	Pst I	310	mp8(Pst I)
	14-3	Pst I	Pst I	270	mp8(Pst I)
	14-4	Pst I	Pst I	680	mp8(Pst I)
	14-5	Pst I	Pst I	680	mp8(Pst I)
	14-6	HpaII	PvuII	570	mp9(SmaI/AccI)
	14-7	Pst I	Pst I	270	mp8(Pst I)
	14-8	HpaII	HpaII	310	mp7(Acc I)
	14-9	Pst I	Pst I	310	mp8(Pst I)
cos52	52-1	Pst I	Pst I	640	mp8(Pst I)
	52-2	Pst I	BglII	1480	mp8(PstI/BamHI)
	52-3	PvuII	PvuII	730	mp8(Sma I)
	52-4	Pst I	Pst I	640	mp8(Pst I)
	52-5	PvuII	PvuII	640	mp8(Sma I)
	52-6	BamHI	Pst I	1520	mp8(PstI/BamHI)
cos55	55-1	HpaII	HpaII	380	mp7(Acc I)
	55-2	HpaII	HpaII	2170	mp7(Acc I)
	55-3	Taq I	HpaII	470	mp8(Acc I)
	55-4	Pst I	BamHI	770	mp8(PstI/BamHI)

Tabelle 2

Tabelle 2: Hybridisierungs- und Sequenzierungs-Subclone der analysierten Charon- und Cosmidclone.

Die einzelnen Spalten der Tabelle zeigen die Phagen bzw. Cosmid-Clonnummern, die Bezeichnung der Subclone, die Restriktionsenden der eingebauten Fragmente und die des Vektors, die Größe der eingebauten Restriktionsfragmente sowie den jeweiligen Typ des Vektors (zur Nomenklatur der Clone siehe auch 7.)

peptids sowie der codierenden Region entsprechen denen der Referenzen 27 und 28. Außerdem ist aus der Abbildung die Lage der einzelnen "framework-" (FR) und "complementarity-determining regions" (CDR) zu entnehmen (27, 28). Aus Abildung 11 geht hervor, daß die Sequenz des Gensegments V55 erst innerhalb des Codons -13 des Signalpeptids beginnt.
Die Abbildungen 13A, 13B, 13C und 13D zeigen jeweils ein Autoradiogramm eines Sequenzgels oder einen Ausschnitt daraus. In der Abbildung erkennt man, in welchem Maße die Auflösung des Bandenmusters der Sequenzreaktionen von der Dauer der Elektrophorese abhängt.

Abbildungen 6 bis 12: Sequenzen von V1, V2, V4A, V4B, V14, V52 und V55.

Dargestellt sind die ermittelten Sequenzen von V1, V2, V4A, V4B, V14, V52 und V55. Die vier Nucleotide sind durch A, G, C und T repräsentiert. Stellen, an denen bei der Sequenzierung nicht eindeutig zwischen zwei oder drei verschiedenen Nucleotiden unterschieden werden konnte, sind durch Symbole gekennzeichnet. Dabei bedeuten: 5 = A oder C; 7 = A oder T; W = A,G oder T, nicht C; X = A,C oder T, nicht G; Y = C oder T. Über den DNA-Sequenzen sind die potentiellen b.z.w. formalen Translationsprodukte abgebildet (zur Definition siehe 3.5.). Die Start- und Endpunkte der Aminosäure-Sequenzen wurden entsprechend der Referenzen 2 und 27 gewählt. In den translatierten Bereichen sind folgende Subregionen gekennzeichnet: L, L', Signalpeptid; FR 1, 2, 3, "framework-regions"; CDR 1, 2, 3, "complementarity determining regions". Die Hogness-Signalsequenz (38) und die V-J-Umlagerungssignalsequenzen (27) sind hervorgehoben. In Abbildung 10 repräsentiert der unterstrichene Bereich eine repetitive Sequenz. Der Startpunkt des Signalpeptids ist in den Sequenzen von V2 und V14 durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Dies bedeutet, daß erst aus dem in Abbildung 14 gezeigten Sequenzvergleich ein möglicher, ursprünglicher Signalpeptid-Startpunkt ermittelt werden konnte.

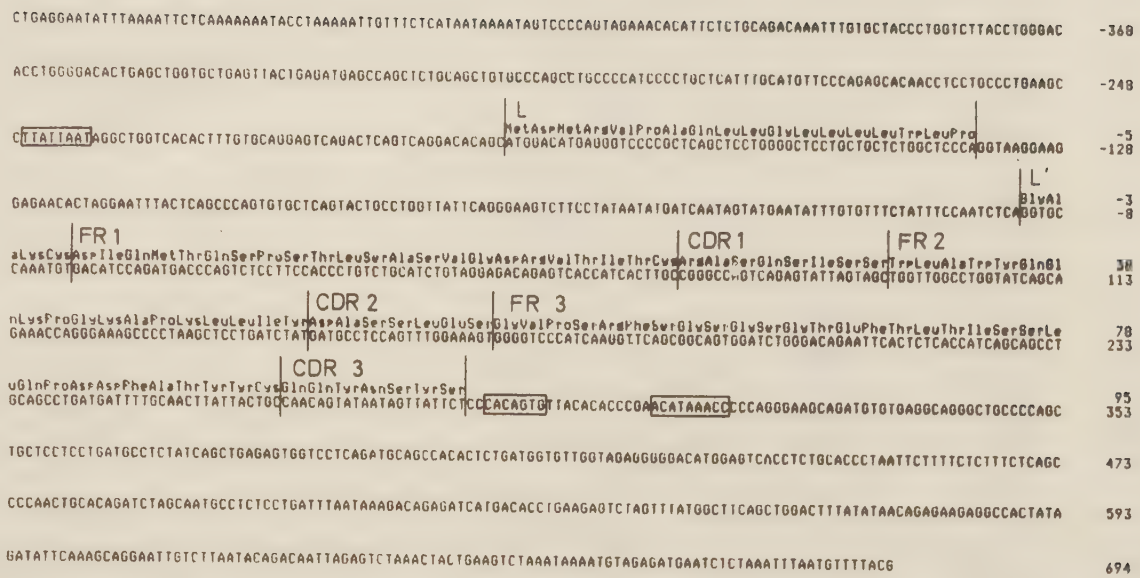


Abb. 6: Sequenz von V1

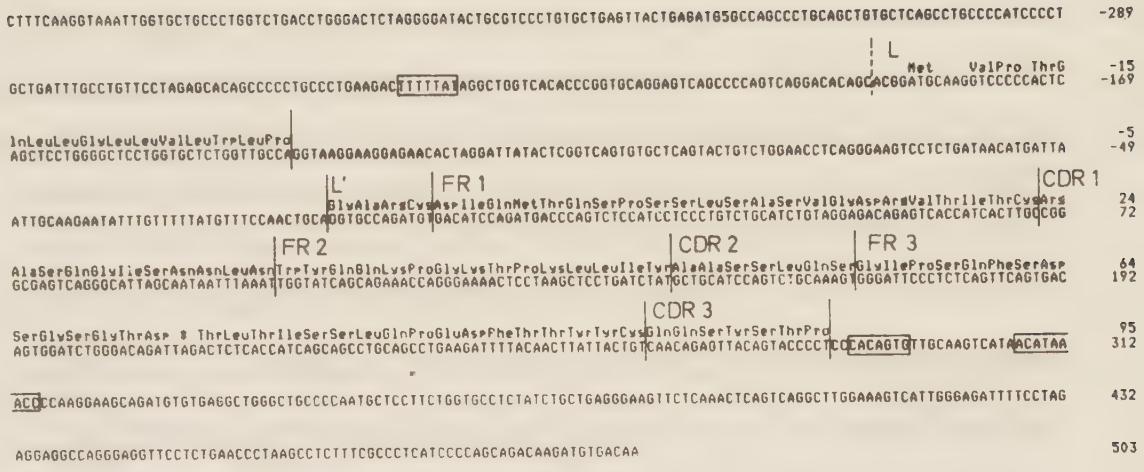


Abb. 7: Sequenz von V 2

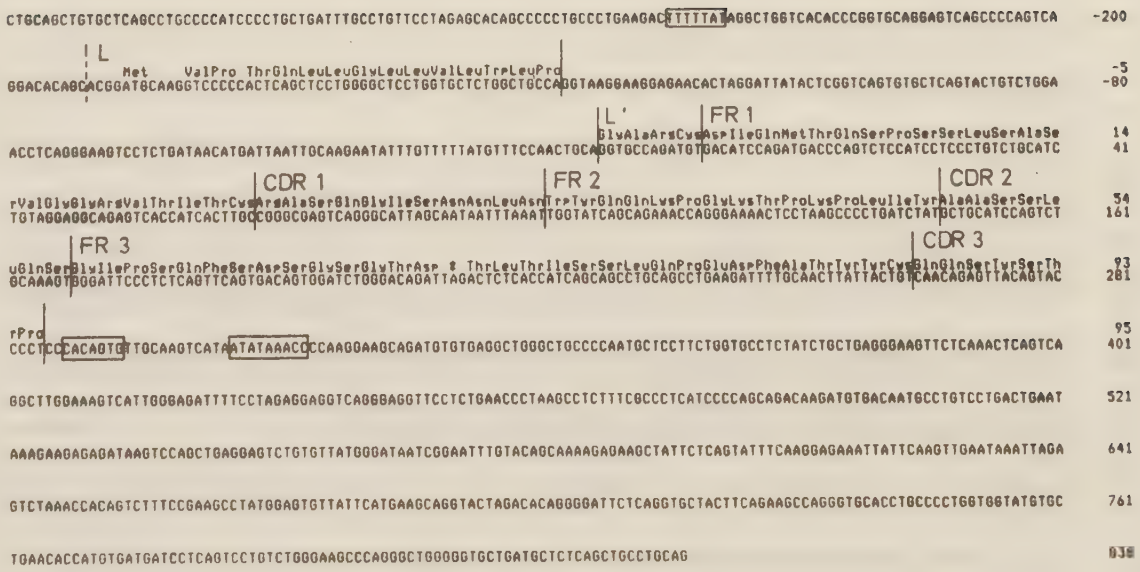
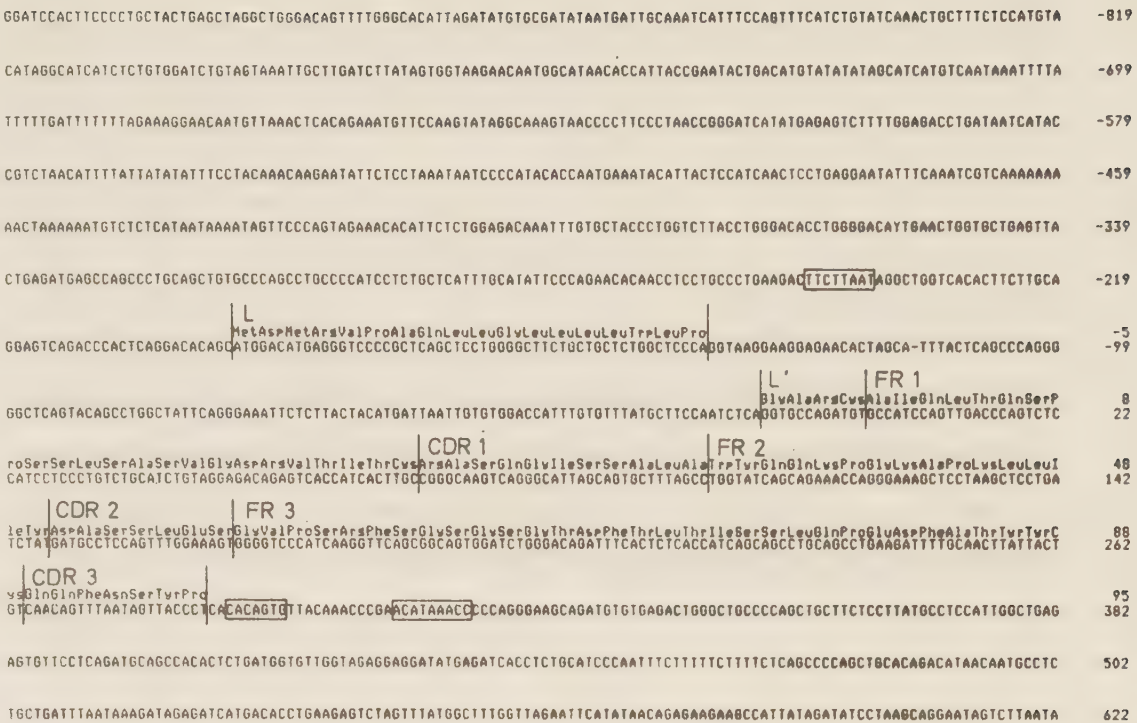


Abb. 8: Sequenz von V 14


L
L'
FR 1
CDR 1
FR 2
CDR 2
FR 3
CDR 3

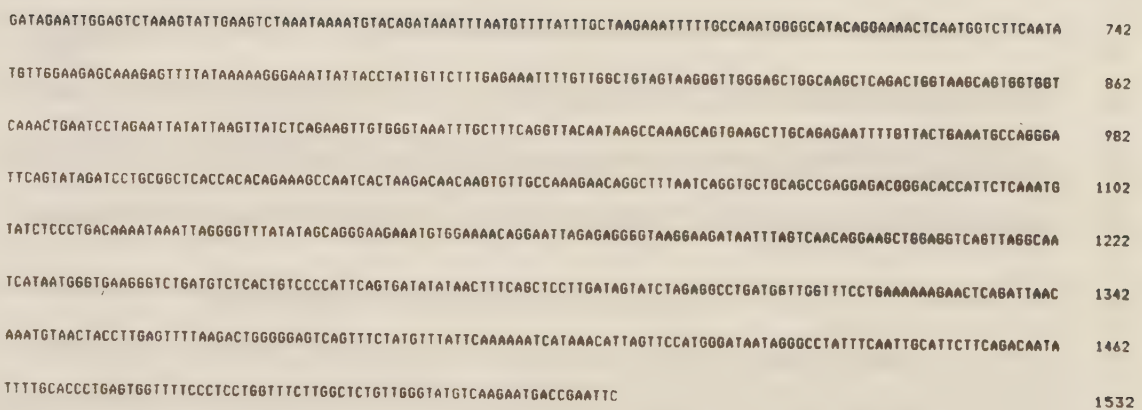


Abb. 9: Sequenz von V4/A

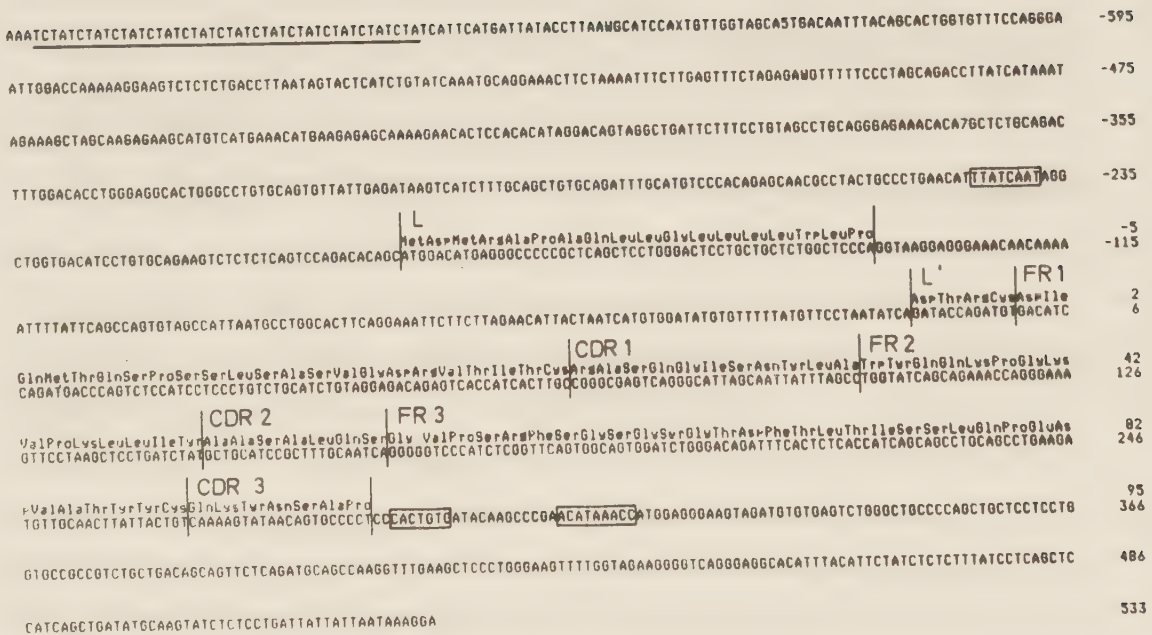


Abb. 10: Sequenz von V 52

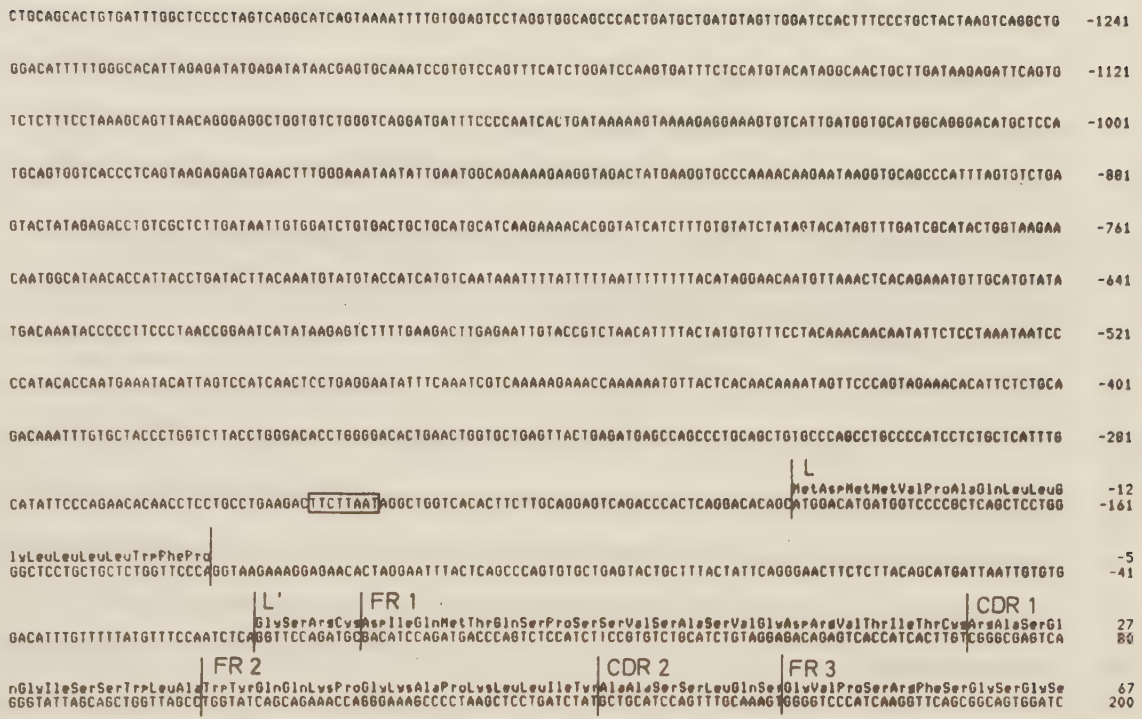

L
L'
FR 1
CDR 1
FR 2
CDR 2
FR 3

Abb. 11: Sequenz von V4/B

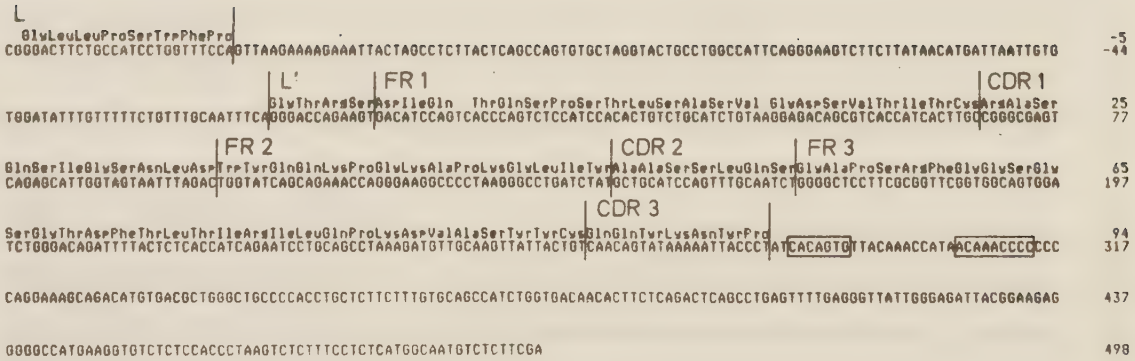


Abb. 12: Sequenz von V 55

Abbildung 13: Autoradiogramme von Sequenzgelen mit verschiedenen Auflösungsbereichen.

Bild A: Autoradiogramm eines Sequenzgeles mit Sequenzreaktion des Clons 14-7. Die Sequenzreaktion wurde solange elektrophoretisch aufgetrennt, bis das in den Proben enthaltene Bromphenolblau 3 cm über dem unteren Rand des Gels war. Länge der lesbaren Sequenz: 130 Nucleotide (vgl. Abbildung 8, komplementäre Sequenz zur dargestellten Sequenz von Position 231 bis 101).
Bild B: Autoradiogramm eines Sequenzgels mit Sequenz reaktion des Clons 4-5. Die Sequenzreaktion wurde elektrophoretisch aufgetrennt, bis das in der Probe enthaltene Bromphenolblau die Unterkante des Gels erreichte und das Xylencyanolblau eines zu diesem Zeitpunkt aufgetragenen Farbmarkers im Gel eine Strecke von etwa 15 cm zurückgelegt hatte. Länge der lesbaren Sequenz: 151 Nucleotide (vgl. Abbildung 9, komplementäre Sequenz zur dargestellten Sequenz von Position 726 bis 575).
Bild C und Bild D zeigen Ausschnitte aus einem 100 cm Sequenzgel, das 16 h elektrophoretisiert wurde. Bild C zeigt die Auftrennung von Fragmenten einer Länge von 405 bis 465 Nucleotiden, in Bild D ist der untere Bereich des Gels abgebildet, in welchem Fragmente einer Länge von 236 bis 260 Nucleotiden getrennt worden sind.

Abb. 13 A

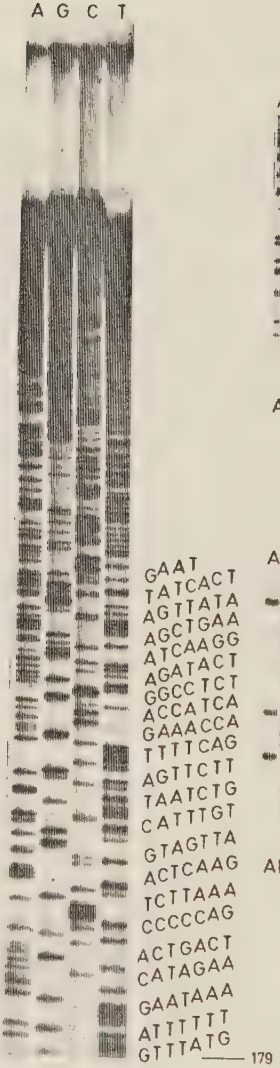


Abb. 13 B

Abb. 13 C

Abb. 13 D

3. DISKUSSION

Für die Sequenzierung der V-Genbereiche wurde die Methode von Sanger et al. (29) angewendet. Dabei wurde insbesondere versucht, die Sequenzierung auf große DNA-Fragmente auszudehnen. Aus einem Vergleich der auf diese Weise erstellten DNA-Sequenzen sowie der daraus abgeleiteten potentiellen (siehe Text) bzw. formalen Translationsprodukte mit bereits veröffentlichten Nucleotid- oder Aminosäure-Sequenzen menschlicher V_K-Gensegmente (2, 16, 27, 30, 31) ergeben sich Lösungsvorschläge zu folgenden Fragen: I. Welche der ermittelten Sequenzen könnten an identischen Positionen äquivalenter Chromosomen lokalisiert sein? II. Wie groß ist der Abstand einzelner V_K- Gensegmente voneinander und wie ist ihre relative Orientierung zueinander? III. Kann mit Hilfe der vorliegenden Daten der Anteil von Pseudogenen im V_KI-Genkompartiment abgeschätzt werden? IV. Gibt es identische DNA- oder Aminosäuresegmente in verschiedenen V_K-Gensegmenten? V. Wie hoch sind die durchschnittlichen Sequenzdivergenzen der CDR-Regionen verglichen mit den flankierenden Sequenzen sowie anderen Sequenzbereichen der V_K-Gensegmente? VI. Wie eng ist die Verwandtschaft zwischen verschiedenen Mitgliedern der V_K-Multigenfamilie?

3.1. Abwägung verschiedener Sequenzierungsstrategien und -techniken

Nachdem in der Arbeitsgruppe bisher für die Sequenzierung gekaufte Komponenten verwendet worden waren (P.L. Biochemicals), wurden diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit so weit als möglich durch selbst

zusammengestellte ersetzt. Dies geschah mit der Absicht, schließlich Reaktionsgemische herzustellen, die es durch ein geeignetes Verhältnis von Desoxy- zu Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphaten erlauben, große, spezifische Polymerisationsprodukte zu erzeugen. Später wurden Reaktionsgemische verwendet, die nach einer Vorschrift von N. Gough (pers. Mitteilung) hergestellt wurden. Außerdem war für die Sequenzierungsarbeiten die Auswahl eines geeigneten "primers" erforderlich. Im folgenden werden kurz die Probleme geschildert, die bei der Anwendung der erhältlichen "primer" auftraten (siehe auch 4.1.1.). Es wurde festgestellt, daß Schwierigkeiten bei Sequenzreaktionen durch Länge (15, 17, 26 bp) und Struktur (Einzelstrang, Doppelstrang) von "primer"-Molekülen bedingt sein können.

Die ursprünglich verwendete "primer"-DNA von 15 bp Länge hybridisierte außer an die entsprechende komplementäre DNA-Sequenz der Einzelstrang-DNA noch zusätzlich an eine weitere Position (Position 787-802 der M13-Sequenz (32)). Dies führte häufig zu nicht eindeutig interpretierbaren Bandenmustern in den Autoradiogrammen der Sequenzgele. Mit einem 26 bp langen "primer" konnte die unerwünschte Anlagerung des "primers" verhindert werden, jedoch trat nun ein anderer nachteiliger Effekt auf: die Autoradiogramme zeigten eine mindestens zehnmal geringere Schwärzung als bei der Anwendung des 15 bp "primers". Die 26 bp "primer"-DNA ist im Gegensatz zu anderen "primer"-DNA's doppelsträngig. Damit erklärt sich die geringere Synthese durch die Kompetition der denaturierten komplementären "primer"-Einzelstränge mit der identischen Sequenz der Phageneinzelstränge in der Renaturierung. Lesbare Sequenzgele ohne Nebenbanden und mit geeigneter Intensität konnten schließlich durch den Einsatz des 17 bp "primers" erstellt werden.

Unerwünschte Nebenbanden in Autoradiogrammen von Sequenzgelen traten auch bei der Sequenzierung von Pst-Fragmenten auf, die im M13 mp7-Vektor inseriert waren. Diese Nebenbanden waren der auf den Clonierungslinker folgenden M13 mp7-Sequenz zuzuordnen. Die Sequenz des Clonierungslinkers selbst konnte in dem überlagernden Bandenmuster nicht gefunden werden. Das auftretende Bandenmuster wäre erklärbar, falls die palindromische Linkersequenz eine Bäumchenstruktur bildete, an der die DNA-Polymerase vorbeiliest. Nach dem Vergleich der Ergebnisse der Sequenzgelauswertungen mit Ergebnissen von Patton et al.(33) ist diese Erklärung wahrscheinlich.

Bei der Abwägung der unterschiedlichen Sequenzstrategien, die für das M13-Phagensystem publiziert waren, wurde für die duchzuführenden Sequenzierungsarbeiten zunächst die Methode von Anderson (23) gewählt. Bei der Anwendung dieser "shotgun"-Sequenzierungsmethode ergaben sich aber Bereiche, die nicht durch Clone repräsentiert waren und andere, die mehrfach repräsentiert waren und deshalb auch mehrfach sequenziert wurden (2.4.2.). Um die Sequenz von V 1 und V 2 zu vervollständigen, wurden die fehlenden Regionen gezielt cloniert.

Zur Sequenzierung der anderen V-Gene wurde erwogen, Methoden ähnlich denen von Frischauf et al. (34), Hong (35) und Poncz (36) anzuwenden. Da alle diese Methoden die Erarbeitung von Enzymkinetiken und mehrere Clonierungs- und Selektionsschritte umfassen, was einen erheblichen Zeitaufwand darstellt, scheint das folgende Vorgehen für dieses Projekt am sinnvollsten zu sein: die entsprechenden DNA-Fragmente werden kartiert und die darauf befindlichen V-Gensegmente werden durch die Proben 1-2, 1-3 und 1-4 möglichst genau lokalisiert. Die gewünschten Restriktionsfragmente werden schließlich in

den erforderlichen Orientierungen in die Vektoren M13 mp 8 und M13 mp9 eingebaut. Die Clonierung und Selektion geeigneter Clone war erheblich schneller durchführbar als in den Referenzen 34, 35 und 36 beschrieben. Dies liegt auch daran, daß diese Autoren zahlreiche Clone benötigen um ein vorgegebenes Stück zu sequenzieren, denn sie wenden keine 100 cm Sequenzgele an. In der vorliegenden Strategie sollten aber Clone mit eingebauter DNA einer Länge von ca. 500-600 bp konstruiert und sequenziert werden. Diese Sequenzstrategie erwies sich als so problemlos und zeitsparend, daß die Gene V 4A und V 4B in nur sechs Wochen feinkartiert, subcloniert und sequenziert werden konnten. In Fällen, in denen aber noch keinerlei Informationen über die Lage einer gewünschten Sequenz innerhalb eines clonierten DNA-Fragments vorliegen, würde wahrscheinlich besonders die in Referenz 36 beschriebene Methode die Methode der Wahl sein.

3.2. Sequenzvergleiche der ermittelten sieben V_K-Sequenzen des Menschen mit einer V_K-Sequenz der Maus

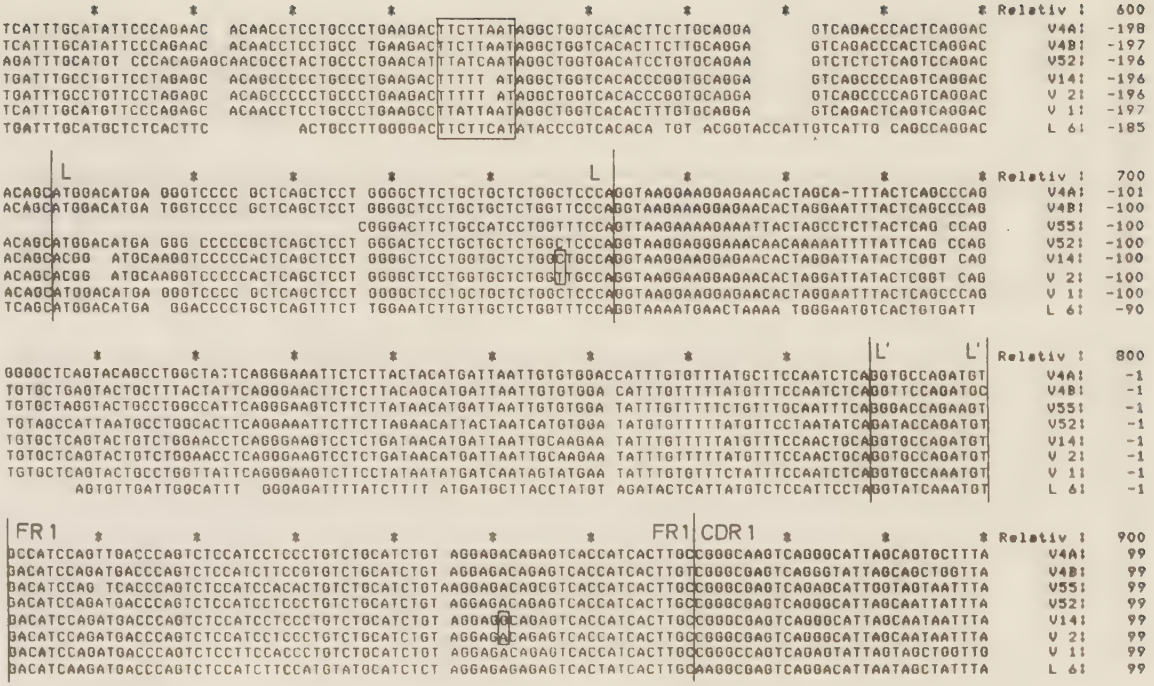
Zunächst wurden die sieben ermittelten V_K-Sequenzen miteinander und mit L6 (20) verglichen (Abbildung 14). Dabei ergab sich, daß die Sequenzdivergenz zwischen zwei Arten (Maus und Mensch) in der gleichen Größenordnung liegt, wie die Sequenzdivergenz zwischen verschiedenen Genen der gleichen Art. Das Maus-Gen unterscheidet sich von den menschlichen Genen zwischen 34,1 und 39,7 %. Die menschlichen Gene sind untereinander in der DNA-Sequenz von 9,4 bis 39,1 % verschieden, wobei in diese Berechnungen von potentiellen Allelen (siehe 3.3.) jeweils nur eines einbezogen wurde.

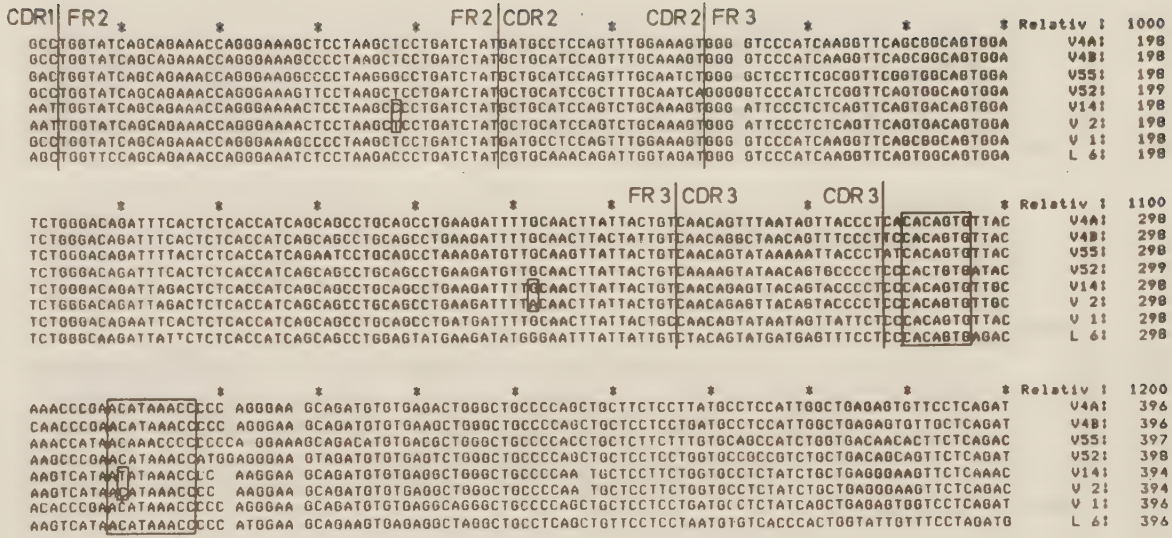
Der Sequenzvergleich zeigt ferner, daß zwischen diesen beiden Arten wichtige Sequenzbereiche und Sequenzpositionen hoch konserviert sind. Dazu gehören die Hogness-Sequenz, der Startpunkt und die Länge des Signalpeptids, die Spleiß-Signalsequenzen, die Länge und die Lage der FR- und CDR-Bereiche sowie die V-J-Umlagerungs-Sequenzen.

3.3. Sequenzpolymorphismen in der V_K-Sequenzfamilie

Bei einem Sequenzvergleich der V_K-Gensegmente V2 und V14 über einem Bereich von 820 bp konnten lediglich sechs Substitutionen ermittelt werden. Diese liegen in Signalpeptid, FR I, FR II, FR III, Nonanucleotid-Signalsequenz und 3'-Flanke (Abbildung 14). Die Restriktionskarten beider Clone sind für vier Nucleasen in einem Bereich von 9 kb identisch (Abbildungen 3 und 5). Weiterhin liegt in einem Bereich von 3,3 kb, der in dem genannten 9 kb-Bereich enthalten ist, eine Spaltmuster-Identität für drei andere Nucleasen vor. Nur ein einziger Spaltstellen-Unterschied für das Enzym Pvu II konnte in der 3'-Flanke gefunden werden (Abbildungen 3 und 5). Bei einer Sequenzdivergenz von nur 0,7% ist es wahrscheinlich, daß die Gensegmente V2 und V14 an identischen Positionen äquivalenter Chromosomen lokalisiert sind. Diese Divergenz liegt im Bereich der Allele $\gamma 2b^a$ und $\gamma 2b^b$ (0.65%) (37) und Va und Va' (0,7%) (31). Für Va (31) wurde bereits gezeigt, daß benachbarte Gene (hier Va und Vb (31)) zehnmal mehr divergent als Allele sind. Andererseits zeigen die Gensegmente HK 134 und HK 137 (28) eine Divergenz von nur 1,7%. Wahrscheinlich sind die letztgenannten das Produkt einer neueren Duplikation. Weil keine geeigneten Spaltstellenunter-

```
         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *  Relativ :   100
                                GCATAACACCATTACCGAATACTGACATGTATATATAGCATCATGTCAATAAATTTTATTTTTGATTTTTTT A      V4A:  -684
                                GCATAACACCATTACCTGATACTTACAAATGTATGTACCATCATGTCAATAAATTTTATTTTTAATTTTTTTTA      V4B:  -682
                                AAATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCATTCATGATTATACCTTAAWGCATC      V52:  -641

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *  Relativ :   200
GAAAGGAACAATGTTAAACTCACAGAAATGTTCCAAGTATAGG CAAAGTAACCCCTTCCCTAACCGGGATCATATGAGAGTCTTTTGGAGACCTGATAA      V4A:  -585
CATAGGAACAATGTTAAACTCACAGAAATGTTGCATGTATATGACAAA TACCCCCTTCCCTAACCGGAATCATATAAGAGTCTTTTGAAGACTTGAGAA      V4B:  -583
CAXTGTTGGTAGCA5TGACAATTTACAGCACTGGTGTTTCCAGGGAATTGGACCAAAAAGGAAGTCTCTCTGACCTTAATAGTACTCATCTGTATCAAAT      V52:  -541

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *  Relativ :   300
TCATACCGTCTAACATTTTATTATATATTTCCTACAAACAAGAATATTCTCCTAAATAATCCCCATACACCAATGAAATACATTACTCCATCAACTCCTG      V4A:  -485
TTGTACCGTCTAACATTTTACTATGTGTTTCCTACAAACAACAATATTCTCCTAAATAATCCCCATACACCAATGAAATACATTAGTCCATCAACTCCTG      V4B:  -483
GCAGGAAACTTCTAAAATTTCTTGAGTTTCTAGAGAWGTTTTTCCCTAGCAGACCTTATCATAAATAGAAAGCTAGCAAGAGAAGCATGTCATGAAACAT      V52:  -441
                                                                                                  CTG      V 1:  -485
                                                                                                  GAA      L 6:  -461

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *  Relativ :   400
AGGAATATTTCAAATCGTCAAAAAAAAACTAAAAAA TGTCTCTCATAATAAAATAGTTCCCAGTAGAAACACATTCTCTGGAGACAAATTTGTGCTACC      V4A:  -386
AGGAATATTTCAAATCGTCAAAAAGAAACCAAAAAA TGTTACTCACAACAAAATAGTTCCCAGTAGAAACACATTCTCTGCAGACAAATTTGTGCTACC      V4B:  -384
GAAGAGAGCAAAAGAACACTCCACACATAGGACAGTAGGCTGATTCTTTCCTGTAGCCTGCAGGGAGAAACACA7GCTCTGCAGAC   TTTGGAC      V52:  -348
                                                                                          CTTTCAAGGTAAATTGGTGCTGCC      V 2:  -385
AGGAATATTTAAAATTCTCAAAAAAATACCTAAAAATTGTTTCTCATAATAAAATAGTCCCCAGTAGAAACACATTCTCTGCAGACAAATTTGTGCTACC      V 1:  -385
ATATATTATTCAAAATAGAGACTACCTACAATAGAAATGACATCTATAATTATAAATCTTTGAAAAGAAATTCATTTTCTGGAGATATTCAAGTGGTTTG      L 6:  -361

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *  Relativ :   500
CTGGT CTTACCTGGGACACCTGGGGACAYTGAACTGGTG  CTGAGTTACTGAGATGAGCCAGCCCTGCAGCTGTG CCCAGCCTGCCCCATCCTCTGC      V4A:  -290
CTGG1 CTTACCTGGGACACCTGGGGACACTGAACTGGTG  CTGAGTTACTGAGATGAGCCAGCCCTGCAGCTGTG CCCAGCCTGCCCCATCCTCTGC      V4B:  -288
         ACCTGGGAGGCACTGGGCCT          GTGCAGTGTTATTGAGATAAGTCATCTTTGCAGCTGTG                   C      V52:  -289
                                                                                 CTGCAGCTGTG CTCAGCCTGCCCCATCCCCTGC      V14:  -287
CTGGT CTGACCTGGGACTCTAGGGGATACTGCGTCCCTGTGCTGAGTTACTGAGATGSGCCAGCCCTGCAGCTGTG CTCAGCCTGCCCCATCCCCTGC      V 2:  -287
CTGGT CTTACCTGGGACACCTGGGGACACTGAGCTGGTG  CTGAGTTACTGAGATGAGCCAGCTCTGCAGCTGTG CCCAGCCTGCCCCATCCCCTGC      V 1:  -289
ACCTCAGTCATCTGGGGACACTGGCCT    TGAGTTAA GTG         CTGACATGAGCAAGTCTTGCACCTGTGTCCCAGCAATAACTGGTTCCCAA      L 6:  -273
```


Relativ : 600
V4A: -198
V4B: -197
V52: -196
V14: -196
V 2: -196
V 1: -197
L 6: -185
L
Relativ : 700
V4A: -101
V4B: -100
V55: -100
V52: -100
V14: -100
V 2: -100
V 1: -100
L 6: -90
L'
L'
Relativ : 800
V4A: -1
V4B: -1
V55: -1
V52: -1
V14: -1
V 2: -1
V 1: -1
L 6: -1
FR1
FR1
CDR1
Relativ : 900
V4A: 99
V4B: 99
V55: 99
V52: 99
V14: 99
V 2: 99
V 1: 99
L 6: 99


CDR1 FR2 FR2 CDR2 CDR2 FR3
Relativ : 1000
V4A: 198
V4B: 198
V55: 198
V52: 199
V14: 198
V 2: 198
V 1: 198
L 6: 198
FR3 CDR3 CDR3
Relativ : 1100
V4A: 298
V4B: 298
V55: 298
V52: 299
V14: 298
V 2: 298
V 1: 298
L 6: 298
Relativ : 1200
V4A: 396
V4B: 396
V55: 397
V52: 398
V14: 394
V 2: 394
V 1: 396
L 6: 396

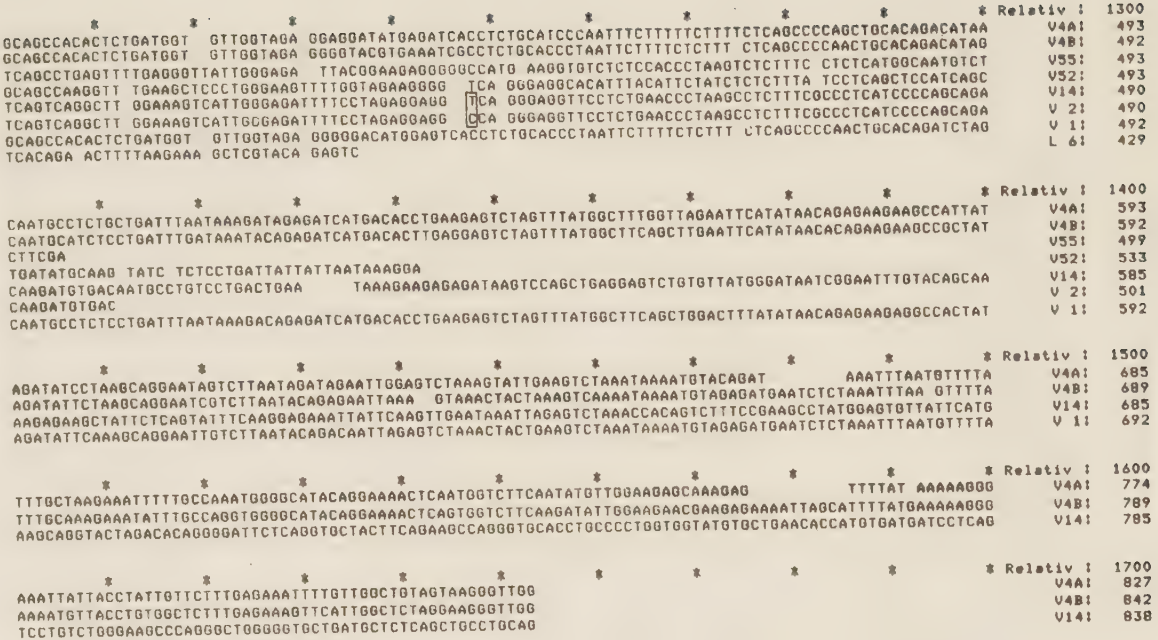


Abbildung 14

Abbildung 14: Sequenzvergleich der ermittelten V_K-Sequenzen mit einer V_K-Sequenz der Maus.

Dargestellt sind die sieben ermittelten DNA-Sequenzen sowie die in Referenz 20 beschriebene DNA-Sequenz von L6. Die Sequenzen wurden mit Hilfe eines in 4.2.13. beschriebenen Computerprogrammes auf die größtmögliche Homologie gebracht (DNMAHO). Dabei wurden gegebenenfalls auch Lücken eingeführt. Die Signalsequenzen sowie die Subregionen des V-Gensegments sind wie in den Abbildungen 6 bis 12 gekennzeichnet. Die sechs Basenpaaraustausche zwischen V2 und V14 sind schwarz eingefaßt.

schiede bei V2 und V14 vorliegen, war es leider nicht möglich ähnliche Hybridisierungsexperimente wie für HK 134 und HK 137 (28) zur Untermauerung der Argumentation durchzuführen.

Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Gene V4A und V4B können aufgrund der Restriktionskartenidentität in einem Bereich von 11 kb und der Sequenzhomologie von 99,3% (V4A) in einem Bereich von 2150 bp sowie der Sequenzhomologie von 98,7% (V4B) in einem Bereich von 2375 bp als allelisch zu den Gensegmenten Va und Vb (31) angesehen werden.

3.4. Abstand und Orientierung von V_K-Sequenzen

Aus der Sequenzierung von V4A und V4B ergab sich auch die genaue Lage innerhalb der eingebauten DNA von Ch 4. Daraus ergibt sich ein Abstand dieser Gensegmente von 5,2 kb (Abbildung 3). Weitere Angaben zum Abstand von V_KI-Genen lassen sich aus der Karte von cos 51 entnehmen, das von den untersuchten Cosmidclonen die

längste Human-DNA-Insertion trägt. Der mit 1-1 hybridisierende Bereich (ein 2,1 kb Bgl II-Fragment) wird hier von nicht mit 1-1 hybridisierenden Bereichen einer Länge von 6,5 und 20,8 kb eingeschlossen.

Die Sequenzdaten von Ch 4 zeigen außerdem, daß die beiden benachbarten V-Gensegmente in derselben Orientierung hintereinander angeordnet sind.

3.5. Pseudogene der V_K-Sequenzfamilie

In unserer Arbeitsgruppe wurden bislang insgesamt 12 Gensegmente der V_K-Subgruppe I sequenziert (30, 31). Fünf von diesen können nach einer Umlagerung an eines der entsprechenden J-Segmente wahrscheinlich keinen funktionellen V-Genbereich generieren und werden deshalb als Pseudogene bezeichnet : V2, V14, V52, V55 (Abbildung 14) und Va (31). In all diesen Pseudogenen und im Pseudogen HK 100 (27) wurden beim Vergleich der Hogness-Signalsequenz mit der in Referenz 38 beschriebenden Consensus-Sequenz Basenaustausche gefunden. Welche Subregionen dieser Gene durch Deletionen, Insertionen und Substitutionen inaktiviert wurden, kann aus Abbildung 15 entnommen werden. Die Spleiß-Signalsequenzen von V52 und V55 (Abbildung 14) unterscheiden sich zum Teil von der bekannten Spleiß-Consensussequenz (38). Das Pseudogen V52 (ebenso wie Va (31)) zeigt einen Basenaustausch in der Heptanucleotidsignalsequenz (Abbildung 14). In jedem der Pseudogene konnten mehrere Mutationen gefunden werden, die zu einer Inaktivierung des jeweiligen Gens führen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten und andere Daten (27, 31) lassen noch keine genaue Berechnung der Menge der Pseudogene innerhalb der Subgruppe zu, jedoch

scheint die Anzahl relativ hoch zu sein. Dies kann das Ergebnis der Evolution dieser Multigenfamilie sein (39), denn die Akkummulation von Substitutionen in V-Gensegmenten ist von essentieller Bedeutung für die Erzeugung der Antikörper-Diversität. Wenn diese Pseudogene in Mechanismen ähnlich der Genkonversion involviert werden, könnten sie einerseits als Donorsequenz fungieren und damit zur Antikörper-Diversität beitragen und andererseits als Akzeptorsequenz Anwendung finden und dabei zu einem funktionellen Gensegment konvertiert werden. Pseudogene können als Mitglieder einer Multigenfamilie im Genom bewahrt werden, da das Überleben des Individuums nicht von der Funktionsfähigkeit eines einzelnen Genfamilienmitgliedes abhängt.

3.6. Vergleiche aller bisher bekannten Aminosäure- und DNA-Sequenzen der V_KI-Subgruppe des Menschen

Alle vollständigen V_KI-Aminosäure-Sequenzen (2) und alle V_KI-Nucleinsäuresequenzen anderer Arbeitsgruppen (27, 28) sowie unserer Arbeitsgruppe (30, 31) wurden untereinander und mit den in dieser Arbeit bestimmten sieben Sequenzen verglichen. Zu diesem Zweck war es notwendig auch von Pseudogenen, die Leserasterverschiebungen sowie Stop-Codons im codierenden Bereich enthalten, zumindest formale Translationsprodukte herzustellen (Abbildungen 6 bis 12). Bei welchen der Nucleotidpositionen der sequenzierten Gensegmente es sich um Insertionen b.z.w. Deletionen handelt, wurde durch einen Vergleich aller in dieser Arbeit gezeigten DNA-Sequenzen untereinander ermittelt (Abbildung 14). Zunächst wurde festgestellt, daß es sich bei allen gezeigten Sequenzen um Mitglieder der Subgruppe I (2, 3,

15) handelt. Bei dieser Zuordnung wurde geprüft, ob bestimmte Positionen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen identisch zu den mit 95%iger Wahrscheinlichkeit auftretenden Aminosäuren der Subgruppe I sind (2). Vor dem Absuchen der Phagengenbank wurden Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen der Probe (L6) und der bekannten V_K-Aminosäuresequenzen des Menschen (2) durchgeführt. Dabei war die Homologie zwischen L6 und der Subgruppe I menschlicher V_K-Gensequenzen mit 56,4 % am höchsten. Deshalb wurde vermutet hauptsächlich oder ausschließlich V_K-Sequenzen aus der Phagengenbank zu isolieren. Bei der Verwendung des Subclones 1-1 aus der Phagengenbank zur Analyse der Cosmidgenbanken wurden zunächst auch nur V_K-Sequenzen gefunden. Inzwischen liegen in der Arbeitsgruppe weitere Ergebnisse vor, die es erlauben auch Clone der Subgruppen II, III und IV aus Genbanken zu isolieren.

Außerdem wurden alle veröffentlichten, nichtallelischen V_K-DNA-Sequenzen untereinander und mit den DNA-Sequenzen dieser Arbeit verglichen; dies waren Va, Vb, Vd, Ve (31), V13 (30), V1, V14, V52, V55, HK 100, HK 134 und HK 137 (27,28).

3.6.1. Identische oder ähnliche Subregionen verschiedener V_K-Gensegmente

Der Aminosäure-Sequenzvergleich erbrachte auch, daß unterschiedliche V_K-Sequenzen der Subgruppe identische Subregionen, d.h. Genunterbereiche wie sie durch Variabilitätsdiagramme der Aminosäuresequenzen von Kabat definiert worden sind, enthalten. Die gefundene Anzahl gleicher Subregionen geht aus Abbildung 15 hervor.

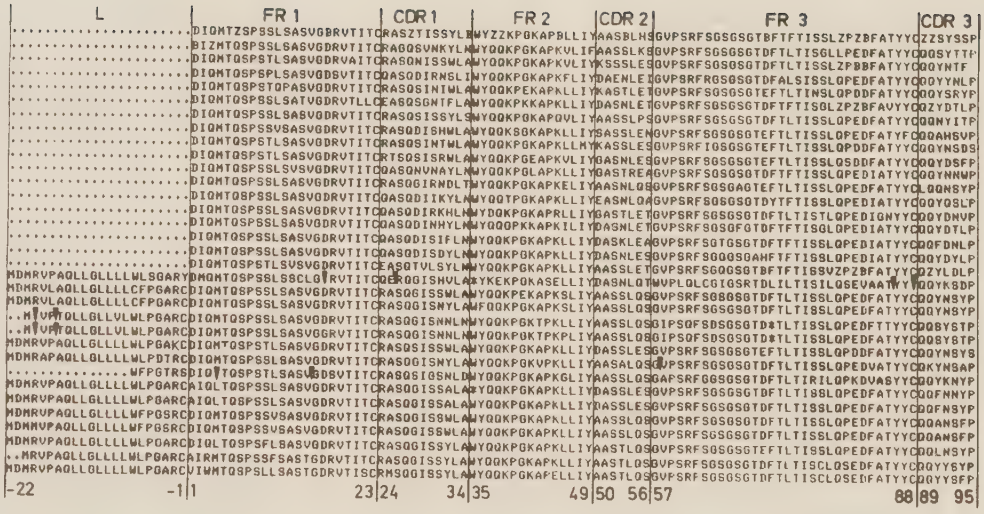


Abbildung 15

Abbildung 15: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Subgruppe I-Gensegmenten

Dargestellt ist der Vergleich der in den Referenzen 2, 27, 28, 30 und 31 angegebenen und der in dieser Arbeit gezeigten Aminosäure-Sequenzen der Subgruppe I. Die Protein-Sequenzen aus Referenz 2 sind an Myelomproteinen (Bence-Jones-Proteinen) erstellt worden. Die Signalpeptid-Sequenz dieser Proteine ist deshalb nicht bekannt. Diese Sequenzen werden nur bis zur letzten Position von CDR 3 angegeben; die zugehörigen, sequenzierten J-Segmente werden nicht gezeigt. Bei den Sequenzen von HK 100, V2, V14, V52, V55 und Va handelt es sich um die formalen Translationsprodukte von Pseudogenen (siehe auch 3.6.). Die Stellen, an denen die DNA-Sequenz die entsprechenden Basenaustausche, -insertionen und -deletionen enthält, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die einzelnen Aminosäurepositionen sind im Einbuchstabencode angegeben, Stop-Codons werden durch Sternchen symbolisiert. Die Subregionen sind entsprechend den Abbildungen 6-12 bezeichnet, ihre ersten und letzten Aminosäurepositionen sind durch die eingetragenen Zahlen gekennzeichnet. Unter den Spalten der Subregionen sind in Gruppen jeweils die Sequenzen angegeben, die in dieser Subregion identisch sind. Identitäten zwischen möglichen Allelen werden nicht angegeben.

Nachfolgend wurden, sofern bekannt, die zugehörigen DNA-Sequenzen verglichen. Dabei ergab sich, daß sich die Ausdehnung identischer DNA-Bereiche über die Subregionen hinaus erstrecken kann. Beispielsweise sind die CDR I-Bereiche der Aminosäuresequenzen von HK 137 und V52 identisch (Abbildung 15), die DNA-Sequenzen sind in einem Bereich, der darüber hinausgeht, identisch (Abbildung 16). Alle im Sequenzvergleich gefundenen Fälle sind in Abbildung 16 durch schwarze Balken gekennzeichnet, dabei stammen aus der vorliegenden Arbeit die Sequenzen von V1, V2 und V52.
Die zugehörigen identischen DNA-Segmente fallen also eindeutig nicht mit der Länge der von Kabat (2) definierten Subregionen zusammen (Abbildung 16). Den V_K-Sequenzen der Subgruppe sind sogar in mehreren Fällen Be-

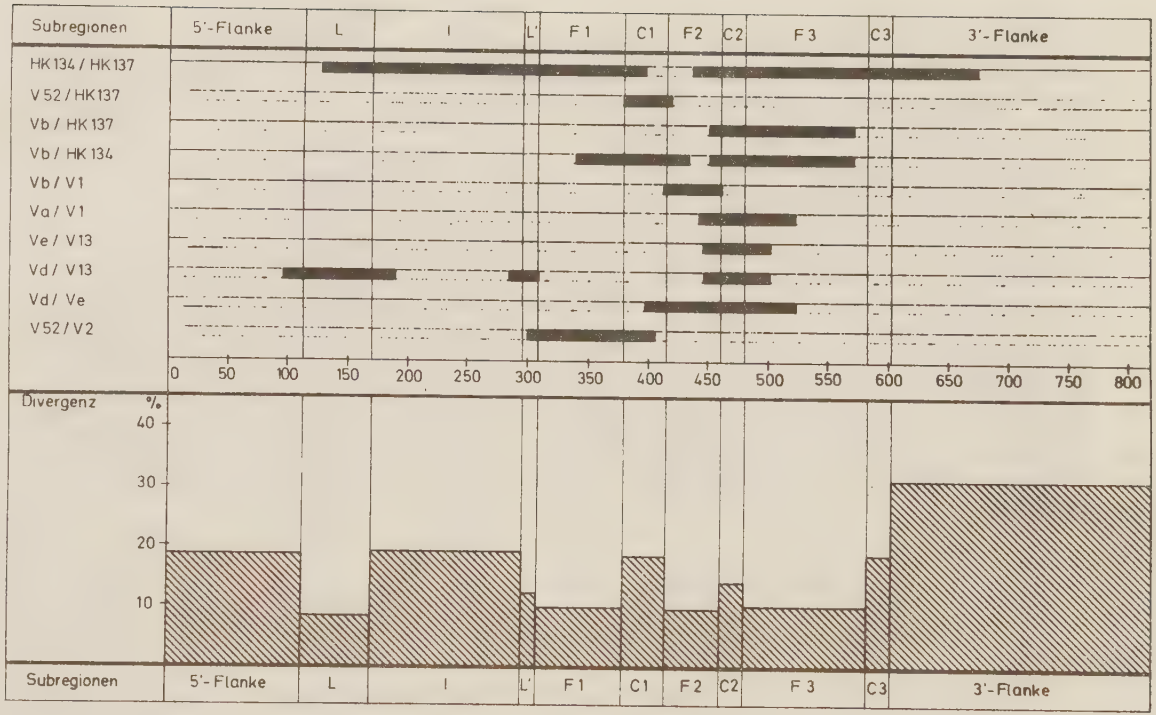


Abbildung 16

Abbildung 16: Vergleich von V_K-DNA-Sequenzen und Angabe von Divergenzwerten der V_K-Subregionen.

Im oberen Teil der Abbildung wird ein Vergleich der DNA-Sequenzen der Gensegmente V1, V2, V52, V13 (30), Va, Vb, Vd, Ve (31), HK 134 und HK 137 (28) gezeigt. Für die Sequenzvergleiche wurde ein Computerprogramm ausgewählt (DNCHOD, 4.2.13., (31)), das für jede homologe Position einen Punkt auf einer Geraden zeichnet und auf einer darunter verlaufenden Geraden einen Punkt für eine divergente Position zeichnet. Die V_K-Subregionen 5'-Flanke, L (Signalpeptid, Aminosäuren -22 bis -5), L' (Signalpeptid, Aminosäuren -4 bis -1), F 1 (FR 1), C 1 (CDR 1), F 2 (FR 2), C 2 (CDR 2), F 3 (FR 3), C 3 (CDR 3) und 3'-Flanke sind durch senkrechte Linien voneinander abgegrenzt. Homologe Bereiche, die eine Subregion überstreichen, sind in ihrer gesamten Länge durch schwarze Balken hervorgehoben. Die Skaleneinteilung von 0 bis 800 bezieht sich auf relative Sequenzpositionen, die nur für diesen vorliegenden Vergleich zutreffen. Der untere Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis der Berechnung der Divergenz der verschiedenen V_K-Subregionen. Die einzelnen Werte wurden aus einem Vergleich der in 3.6.1. aufgelisteten Sequenzen errechnet.

reiche gemein, die für die hoch variablen Subregionen codieren: Vb, HK 134 (CDR 1); V52, HK 137 (CDR 1); Va, V1 (CDR 2); Vb, HK 134, HK 137 (CDR 2); Vd, Ve, V13 (CDR 2); HK 134, HK 137 (CDR 2) und HK 134, HK 137 (CDR 3) (Abbildung 16) (27, 28, 30, 31).

Weil die Keimbahngene von nicht unterbrochenen DNA-Sequenzen codiert werden (40, 41), ist es auszuschließen, daß die oben genannten Sequenzidentitäten durch Rekombinationen von Minigenen (42, 43, 44) entstanden sind. Die gefundenen Sequenzidentitäten würden sich aber durch andere Mechanismen der Übertragung genetischer Information erklären lassen (31, 37, 45, 46, 47, 48, 49). Der wahrscheinlichste primäre Informationsübertragungsmechanismus wäre in diesem Fall die Genkonversion. Das vorliegende Sequenzdiver-

genzmuster, das auf der Aminosäuresequenzebene irrtümlicherweise als das Produkt der Rekombination sogenannter Minigene (42, 43, 44) interpretiert werden kann, ist letztlich das Ergebnis der auf die Ereignisse ähnlich der Genkonversion folgenden natürlichen Selektion (siehe auch 3.6.).

3.6.2. Polymorphismus einzelner V_K-Subregionen

Mit Hilfe eines Computerprogrammes wurden die Flanken-, die Signalpeptid- und die FR- und CDR-Regionen der oben genannten Gensegmente miteinander verglichen. Der Teil des Signalpeptid codierenden Segments von V55 wurde bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Die sich ergebenden Divergenzwerte aller Vergleiche wurden schließlich addiert und durch die Anzahl der Vergleiche dividiert. Die so errechneten mittleren Divergenzen sind in Abbildung 16 dargestellt. Demzufolge sind CDR 3 und CDR 1 die am stärksten divergenten Subregionen der V_KI-Nucleotidsequenzen. Die am stärksten konservierte Subregion ist FR 2. Die Divergenz der Signalpeptidsequenz ist vergleichbar mit der von FR 1, während die Divergenz der intervenierenden Sequenz vergleichbar ist mit der von CDR 1 und CDR 3 sowie der der 5'-Flanke. Die 3'-Flanke ist deutlich stärker divergent als die anderen Subregionen der V_K-Sequenzen aber dennoch stärker homolog als man es erwarten würde, wenn dieser Flankenbereich völlig freier genetischer Drift unterliegen würde. Nach dem Modell der "concerted evolution" wäre eine Konservierung von Flanken amplifizierter Gene durch die Abfolge von Duplikation, Mutation und nicht reziprokem Crossover erklärbar (50).

3.6.3. Zuordnung der V_KI-Sequenzen zu unterschiedlichen Sequenzfamilien

Die Subgruppeneinteilungen sind das Ergebnis von Aminosäurevergleichen von Myelomproteinen (Bence-Jones-Proteinen) und Kälte-Agglutininen (2, 3, 15). Diesen zufolge gibt es vier voneinander unterscheidbare V_K-Sequenzsubgruppen (2, 3, 15). Innerhalb dieser Subgruppen sind die einzelnen Sequenzen stärker homolog als zwischen den Subgruppen. Durch den Vergleich der oben genannten DNA-Sequenzen, die hierbei in die Abschnitte 5'-Flanke, codierende Region (Signalpeptid, Intervenierende Sequenz, Codon -4 bis 95) und 3'-Flanke unterteilt wurden, sollten Verwandtschaftsgrade der Subgruppenmitglieder untersucht werden. Die Ergebnisse der paarweisen Homologievergleiche sind in Abbildung 17 dargestellt. Es wird deutlich, daß in der 5'-Flanke drei, in der codierenden Region fünf und in der 3'-Flanke vier verschiedene Sequenztypen gegeneinander abgegrenzt werden können. Es muß offen bleiben, zu welchem 5'-Flankentyp die Sequenz von V55 zuzuordnen wäre, da diese, wie in 2.4.3. gezeigt, erst innerhalb des Codons -13 des Signalpeptid-codierenden DNA-Segments beginnt. Aus Abbildung 17 können die durchschnittlichen Homologien innerhalb einzelner Sequenz-typen für verschiedene Sequenzregionen entnommen werden. Man könnte die gezeigten Sequenzen, die aufgrund ihrer potentiellen b.z.w. formalen Translationsprodukte alle der V_K-Subgruppe I zugeordnet wurden, darüberhinaus verschiedenen Unterfamilien zuordnen. Damit ist es wahrscheinlich, daß zumindest die Subgruppe I aus verschiedenen, noch nicht zahlenmäßig bestimmbaren Unterfamilien aufgebaut ist.

Das Gen V14 zeigt in der 5'-Flanke eine hohe Homologie zu den Mitgliedern einer Unterfamilie von Genen. In der 3'-Flanke dagegen, ist es näher zu einer

anderen Unterfamilie verwandt, nämlich der von V52 repräsentierten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Sequenzhomologieverteilung das Ergebnis eines nicht reziproken Crossover oder eines Ereignisses ähnlich der Genkonversion ist.

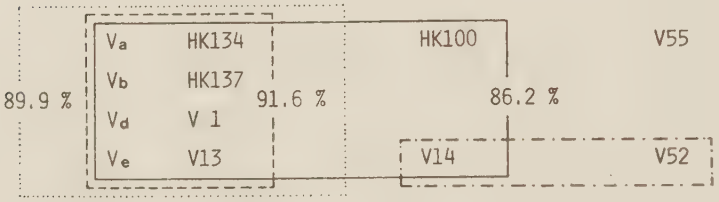


Abbildung 17: Zuordnung der V_KI-Sequenzen zu verschiedenen Sequenzfamilien

Die Abildung faßt die Ergebnisse eines Homologievergleichs der in 3.6.1. aufgelisteten Sequenzen zusammen. Zu diesem Vergleich wurden die Sequenzen in die Abschnitte 5'-Flanke, codierende Region und 3'-Flanke eingeteilt. Die genauen Grenzen der Abschnitte sind in 3.6.3. angegeben. In einzelnen Abschnitten ähnliche Sequenzen sind durch die im folgenden aufgeführten Symbole zusammengefaßt: 5'-Flanke, kontinuierliche Linie; codierende Region, unterbrochene Linie; 3'-Flanke, punktierte Linie und strich-punktierte Linie. Angegebene Prozentwerte beziehen sich auf die mittlere Homologie innerhalb der beschriebenen Gruppen.

3.7. Evolution der V_K-Sequenzfamilie

Von D. Baltimore et al. wurden fünf V_H-Gensegmente verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß diese nicht in einen Stammbaum einzuordnen sind (51). Givol et al. verglichen die Nucleotidsequenzen anderer eng verwandter

V_H-Gensegmente. Dabei fanden sie, daß Basensubstitutionen, die zu Aminosäure- Austauschen führen in CDR 1 und CDR 2 häufiger sind als in den FR-Bereichen (39). Aus ihren Beobachtungen schließen beide Arbeitsgruppen auf einen Evolutionsprozeß, der dazu in der Lage ist in den CDR-Bereichen höhere Sequenzdiversitäten zu erzeugen als in den FR-Bereichen, wobei das besondere Interesse dem bemerkenswerten Unterschied der Häufigkeit stiller Mutationen gilt. Wu & Kabat fanden in der CDR 2 Region eines menschlichen V_H-Segmentes (V_H 26) 14 Nucleotidpositionen, die identisch zu einem menschlichen D-Segment sind (46). Da die V-Gensegmente kontinuierlich im Genom verankert sind, postulieren diese Autoren die Entstehung der beobachteten Homologie durch den Ablauf von Ereignissen ähnlich der Genkonversion. Auch Sequenzvergleiche innerhalb eines Clusters menschlicher V_K-Gene lassen nach Pech et al. (31) auf derartige Ereignisse schließen.

Die vorliegende Arbeit zeigt im wesentlichen zwei Eigenschaften der V_K-Multigenfamilie: sie enthält Gensegmente, die identische FR- und CDR-Bereiche aufweisen und sie enthält einen hohen Anteil an Pseudogenen. Wie im Falle von V_H 26 und einem D-Segment (46) könnten auch die identischen Unterbereiche der hier verglichenen Gensegmente durch Genkonversion erklärt werden (3.5.1.). Sofern die Sequenzen der Pseudogene in solche Ereignisse einbezogen werden können, würde die Möglichkeit bestehen, diese wieder zu funktionellen Gensegmenten zu konvertieren. Außerdem könnten die Sequenzen der Pseudogene durch derartige Prozesse zur Bildung der Antikörperdiversität beitragen (3.4.). Die vorgelegten Daten sowie die Daten anderer Autoren machen es damit wahrscheinlich, daß die Übertragung von Se-

quenzelementen durch Prozesse ähnlich der Genkonversion einen wichtigen Beitrag zur Bildung der Antikörperdiversität im Keimbahnbereich leisten.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Enzyme

Bactoagar und Bactotrypton wurden von Difco, Michigan, bezogen, das Hefeextrakt stammte von Merck, Darmstadt. Alle anorganischen Reagenzien sowie Ethidiumbromid, SDS, Polyethylenglykol 6000 und Tris waren ebenfalls Produkte der Fa. Merck, Darmstadt. Ampicillin ("Amblosin") wurde von Bayer AG, Leverkusen erworben. Sea Kem Agarose und Seaplaque Agarose wurden von Marine Colloids, Rockland, U.S.A. bezogen. Ficoll stammte von Pharmacia, Schweden; Rinderserumalbumin (BSA), Polyvinylpyrrolidon und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktopyranosid (X-Gal) lieferte Sigma GmbH, München. Isopropylthiogalaktosid und Harnstoff wurden bei BRL (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, U.S.A.) gekauft. Für die Nicktranslation und die Sequenzreaktionen wurde [α-^{32}P]-dATP und [α-^{32}P]-dCTP der Fa. New England Nuclear (NEN) verwendet, Desoxy- und Didesoxyribonucleotide für diese Reaktionen lieferte Boehringer Mannheim. Die M 13 Einzelstrangprimer (15 bp, 17bp und 26bp) wurden von P.L. Biochemicals, Ulmenhof, BRD und Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, U.S.A. hergestellt. Acrylamid und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde von SERVA, Feinbiochemica, Heidelberg, BRD, bezogen; Bis-Acrylamid war ein Produkt der Fa. Biomol, Ilversheim, BRD; den Mischbettaustauscher AG 501-X8 stellte Bio*-Rad Laboratories, Richmond, Californien, U.S.A. her. γ-Methacryloxypropyltrimethyloxysilan wurde von Wackerchemie, München, BRD, bezogen; das Dimethyldichlorsilan ("Repelcote") von BDH Chemicals Ltd., Pool, England.

Folgende Enzyme wurden verwendet: Restriktionsenzyme: Acc I, Hind III, Nru I, Sac II und Xho I stammten von New England Biolabs, Beverly, M.A.; Boehringer Mannheim lieferte BamH I, Bgl II, Cla I, Dde XI, Hind III, Hpa II, Kpn I, Pst I, Pvu I, Pvu II, Sal I, Sma I und Taq I. Xba wurde von T. Igo-Kemenes zur Verfügung gestellt.

Weitere von Boehringer Mannheim bezogene Enzyme waren: T4-Ligase, alkalische Phosphatase (Kalberdarm, Grad. I, Ammonsulfatfällung), DNA-Polymerase I (acc. Kornberg), DNA-Polymerase I (großes Fragment, acc. Klenow) und DNAse I (aus Rinderpankreas).

4.1.2. Bakterienstämme, Phagen, Plasmide und DNA's

Die Bakterienstämme E. coli LE 392 (sup F, sup F, m_k^+, r_k^-, met$^-$, trp-R, gal$^-$) und E. coli 490A (r_k^-, m_k^-, met$^-$, thr$^-$, leu$^-$, recA$^-$) waren ursprünglich von Fr. Bolivar et al. (52) b.z.w. R. E. Streeck und G. Hobom (53) konstruiert worden. DNA des von F. R. Blattner (54, 55) konstruierten Phagen Ch 4A wurde von M. Pech nach der in 4.2.3. beschriebenen Methode präpariert und zur Verfügung gestellt. DNA des Plasmids pHR 322 wurde von M. Pech nach der Methode von Tanaka und Weisblum (56) isoliert und ebenfalls zur Verfügung gestellt.

Der Bakterienstamm E. coli JM 103 (Δlac pro, thi, str A, sup E, end A, sbc B15, hsd R4, F'traD36, pro AB, lac I^q, ZAM 15) wurde von P. L. Biochemicals, Milwaukee, U.S.A., bezogen, ebenso die von J. Messing et al. (57) konstruierten Phagen M13 mp7, mp8 und mp9.

Lachsspermien-DNA lieferte Sigma GmbH, München, die λ-DNA Biolabs, New England.

4.1.3. Phagengenbank

Die Phagengenbank (18) wurde freundlicherweise von T. Maniatis zur Verfügung gestellt. Zur Konstruktion der Genbank war Hae III- Alu I gespaltene DNA aus der Leber eines menschlichen Foetus verwendet worden.

4.1.4. Cosmidgenbanken und Cosmidclone

Die Cosmidgenbanken wurden von W. Lindenmaier und J. Collins (30, 58, 59) konstruiert. Zur Herstellung beider Genbanken wurde die gleiche Placenta-DNA verwendet. Nach einer Partialspaltung mit Msp I wurde die DNA mit zuvor durch Cla I linearisiertem pHC 79 b.z.w. pHC 79-2 cos/tk ligiert.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Cosmidclone wurden ursprünglich von M. Pech aus diesen beiden Cosmidgenbanken isoliert und zur Verfügung gestellt.

4.1.5. Hybridisierungsproben

Zur Analyse der Phagengenbank wurde pBR 322-Subclon L6/2 eingesetzt (19, 20) (Abbildung 1). Für Blot-Hybridisierungen wurde der pBR 322-Subclon L6/5 verwendet. Freundlicherweise wurden die DNA's der Subclone von M. Pech isoliert und zur Verfügung gestellt.

4.2. Methoden

4.2.1. Markierung von DNA mit [α-^{32}P]-dATP und [α-^{32}P]-dCTP

Um DNA als Hybridisierungsprobe für die Analyse von Genbanken und Restriktionsspaltmustern benutzen zu können, wurde diese nach (60, 61) durch "Nicktranslation" radioaktiv markiert.

4.2.2. Analyse einer Ch 4A-Genbank durch Plaquehybridisierung

In einer Verdünnungsreihe wurde der Titer der Phagengenbank zu $2x10^8$ Plaque bildenden Einheiten / ml bestimmt. Aus dieser Phagensuspension wurden $2x10^6$ Phagen entnommen, in 17,5 ml SMC-Puffer (0,1 mM $CaCl_2$, 22 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 8,5 mM NaCl, 9,5 mM NaH_2PO_4, 19 mM NH_4Cl) verdünnt und mit 35 ml nach Leder et al. (52) vorbehandelten E. coli LE 392 bei 37° C 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurden je 1,5 ml der Phagen-Zell-Suspension mit 7,5 ml Weichagar gemischt und auf einer vorgetrockneten Agarplatte (Ø 15cm) ausplattiert. Die in den Plaques enthaltene freie Phagen-DNA der 35 Agarplatten wurde, nach Inkubation bei 37° C über Nacht, nach der Methode von Benton und Davis (62) auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit einer wie in 4.2.1. beschriebenen radioaktiven Probe, dem Subclon L 6/5 (19, 20), hybridisiert (4.2.7.).

4.2.3. DNA-Präparation aus pBR-, M 13-, Cosmid- und Charon 4A-Clonen

Die Cosmidclone und der pBR 322 Subclon von V3 wurden in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl, 50 µg/ml Ampicillin) vermehrt. M 13 Subclone wurden vermehrt, indem je 400 ml einer logarithmisch in YT-Medium (8 g Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) wachsenden JM 103 Bakterienkultur (OD_{560} =0,5) mit je 2 ml eines, wie in 4.2.10. beschriebenen, Phagen enthaltenden Kulturüberstandes infiziert wurden.Die Cosmid-DNA, die pBR 322-3-1 DNA und die M 13-RF-DNA wurden nach T. Tanaka und B. Weissblum (56) isoliert, wobei abweichend von dieser Vorschrift keine Phenol- und keine RNAse-Behandlung durchgeführt wurde. Die DNA's wurden mit gleichem Volumen einer 50 mM EDTA-Lösung versetzt, mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol gefällt und 30 Minuten bei 9500 rpm in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Die nachfolgende Reinigung der DNA erfolgte durch zwei CsCl-Gradientenzentrifugationen (n = 1,389) im Vertikalrotor (20 Stunden, 40 000 rpm). Die DNA's wurden von Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit einem CsCl gesättigtem n-Butanol/Isopropanol (1:1)-Gemisch befreit und anschließend 24 Stunden gegen Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) dialysiert. Zur Isolierung von DNA der Phagenclone V1, V2, V3 und V4 wurden die Phagen zunächst wie in 4.2.2. beschrieben durch die Infektion von E. coli LE 392 vermehrt. Nach der Inkubation über Nacht bei 37° C wurde der Weichagar von den Platten entnommen und mit einem gleichen Volumen LB-Medium in Gegenwart von 0,2% Chloroform zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Dem klaren Überstand, der durch Zentrifugation in der Damon/IEC-Zentrifuge (3300 rpm) gewonnen wurde, wurden NaCl ad 40 g/l, RNAse ad 1 µg/ml und DNAse ad 1 µg/ml zugesetzt. Nach einer dreistündigen Inkubation bei

Raumtemperatur wurde noch einmal bei 3300 rpm in der Damon/IEC-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand mit PEG 6000 ad 100 g/l versetzt. Die PEG-Fällung erfolgte über Nacht bei 4°C. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Phagenpräzipitat gewonnen, wobei die Phagen nachfolgend durch einen CsCl-Stufengradienten (n = 1,3632, 1,3815 und 1,3996), einen CsCl-Gleichgewichtsgradienten (n = 1,3815) und eine 24-stündige Dialyse gegen Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) weiter gereinigt und angereichert wurden. Die Phagen-DNA wurde aus den Phagen durch Behandlung mit Proteinase K und anschließender dreimaliger Ethanolfällung isoliert.

4.2.4. Analytische und präparative Agarosegele

Agarose-Gelelektrophoresen wurden nach Referenz 63 durchgeführt, wobei die Agarose-Konzentrationen (Sea Kem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine) zwischen 0,7 und 1,5% variierten. Für Agarosekonzentrationen unter 1% wurde anstelle des Tris-Borat-Puffers (64) Tris-Phosphat-Puffer (65) verwendet. Gel und Puffer enthielten 1 µg/ml Ethidiumbromid. Die Gele wurden unter UV-Licht photographiert (66).
Für präparative Agarosegele wurde Sea Plaque Agarose (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine) verwendet. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten, mit gleichem Volumen 0,6 M NaCl (in 1xTE-Puffer) bei 65°C geschmolzen, eingefroren, langsam aufgetaut und der Agaroseanteil abzentrifugiert; nach Wiederholung dieses Vorgangs wurden die vereinigten Überstände mit Ethanol gefällt und die abzentrifugierte, lyophilisierte DNA in TE-Puffer gelöst.

4.2.5. Präparative Acrylamidgele

Elektrophoresen in 4%-Polyacrylamidgelen (1/20 Bis-Acrylamid, Tris-Borat-Puffer) wurden nach Referenz 67 durchgeführt. DNA-Fragmente wurden aus Polyacrylamidgelen durch Ausschneiden der mit Ethidiumbromid angefärbten Gelstücke isoliert. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gelstückes wurde die DNA durch Elution mit einer 1M NaCl-Lösung, Filtration über Whatman 3MM Papier und anschließender Ethanolfällung gewonnen.

4.2.6. Kartierung rekombinanter Clone mit Restriktionsnucleasen

Die zur Kartierung der verschiedenen Clone erforderlichen Restriktionsspaltungen wurden nach den Referenzen 53 und 61 durchgeführt. Dabei wurde jeweils 1 µg DNA mit einem bezüglich der Enzymaktivität doppelten Überschuß an Nuclease während zwei Stunden bei 37°C, mit Sma I bei 25°C, inkubiert. Für alle Enzyme außer Kpn I wurde ein Universalpuffer folgender Zusammensetzung verwendet: 1,5 mM Spermin, 5 mM Spermidin, 150 mM Tris, 600 mM KCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(ß-aminoethylether)-N,N'-tetraacetat), 70 mM $MgCl_2$, 5 mM Mercaptoethanol. Für Spaltungen mit Kpn I wurde ein Puffer der Zusammensetzung 6 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 , 6 mM Dithiothreitol, 50 µg/ml BSA und 6 mM $MgCl_2$ verwendet.

Nach der Spaltung wurden die Reaktionsgemische mit etwa einem Viertel des Volumens an 50%-iger Saccharose-Lösung, die Bromphenolblau enthält, versetzt und auf eines der in 4.2.4. und 4.2.5. beschriebenen Gele aufgetragen.

4.2.7. DNA-Transfer und Hybridisierung

Die in Agarosegelen aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach der von E.H. Southern (69) beschriebenen Methode auf Nitrocellulosefilter (B.A. 85, Schleicher & Schuell) transferiert und die Filter anschließend 3 Stunden bei 80°C im Vakuumofen gebacken. Die Filter wurden dann, wie unter Referenz 70 beschrieben, mit der radioaktiven Probe hybridisiert.

4.2.8. Subclonierung isolierter DNA-Fragmente in pBR 322

pBR 322-DNA wurde mit Eco RI sowie Bam HI gespalten und danach zur Inaktivierung der Enzyme zehn Minuten lang auf 65°C erwärmt. DNA des Clones Ch V3 wurde mit Eco RI und Bgl II gespalten und das 1,95 kb Eco RI-Bgl II-Fragment wie in 4.2.4. beschrieben isoliert. Vektor-DNA und inserierte DNA wurden in einer nach Referenz 71 berechneten Konzentration in einem Volumen von 20 µl in Gegenwart von 1 U T4-Ligase 3 h bei 15°C ligiert. Die auf diese Weise erhaltene rekombinante Plasmid-DNA wurde zur Transformation von E.coli 490A nach der Vorschrift von Dagert und Ehrlich (72) eingesetzt.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf L-Agarplatten, denen entweder Tetracyclin (Achromycin, Cyanamid, Wolfratshausen) in einer Konzentration von 25 µg/ml oder Ampicillin (Amblosin, Bayer AG, Leverkusen) in einer Konzentration von 30 µg/ml zugesetzt war. Vor dem Ausplattieren der Bakterien wurden 100 µl des Transformationsansatzes in 10 ml L-Medium verdünnt und unter leichtem Schütteln 2 h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden Aliquots auf Ampicillin-L-Agar-Platten ausplattiert. 30 der so ent-

standenen Kolonien wurden mittels eines sterilen Zahnstochers sowohl auf Ampicillin- als auch auf Tetracyclin-Platten übertragen. Von fünf der Kolonien, die lediglich eine Einfachresistenz gegen Ampicillin aufwiesen, wurden nach einer Schnellysat-Methode von Birnboim (73) in einer Modifikation nach Referenz 74 klare Lysate gewonnen. Diese wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen inkubiert, um die Clone zu ermitteln, die ein DNA-Fragment der erwarteten Größe enthielten.

4.2.9. Subclonierung isolierter DNA-Fragmente in M13 mp7, mp8 und mp9

Rekombinante M13 mp7, mp8 und mp9 Phagen wurden mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme wie in 4.2.8. beschrieben konstruiert. Die Transfektion von E.coli JM103-Bakterien wurde nach J. Messing et al. (57) in einer Modifikation von K. Moore (pers. Mitteilung) ausgeführt. Rekombinante Clone sind bei dieser Methode durch die Ausbildung farbloser anstelle blauer Plaques zu erkennen. Die farblosen Plaques wurden mit Hilfe eines Zahnstochers in 5 ml einer logarithmisch wachsenden E.coli JM103-Kultur (OD_{560} = 0,5) übertragen und 6-7 Stunden bei 37°C geschüttelt. Darauf wurde aus den infizierten Bakterien die replikative Form der rekombinanten Phagen wie in 4.2.8. beschrieben isoliert und analysiert.

4.2.10. Sequenzgele

Für die Auftrennung der bei den Sequenzreaktionen gebildeten DNA-Fragmente wurden 6% Acrylamid-Gele nach (75) hergestellt. Um die einzelnen Sequenzreaktionen bis zu einer Länge von ungefähr 600 bp auswerten zu können, wurde neben zwei verschieden langen Läufen auf 40 cm langen Gelen (1. BP unten b.z.w. 2. BP 1/2) ein weiterer Lauf auf einem 100 cm langen temperierten Sequenzgel (55°C, 16 h, 3800 V) durchgeführt. Dazu wurde eine Elektrophorese-Apparatur nach Ansorge (pers. Mitteilung und Referenzen 24, 25, 26) gebaut.

Autoradiogramme solcher Sequenzgele sind in den Abbildungen 13A bis 13D gezeigt.

4.2.11. Autoradiogramme

Die Autoradiographie erfolgte bei -80°C mit Kodak X-Omat XR 5 Filmen. Zur Signalverstärkung wurden dabei gegebenenfalls Cawo SE6-Schirme verwendet. Autoradiogramme fixierter und getrockneter Sequenzgele wurden durch Exposition der jeweiligen Gele bei Raumtemperatur gewonnen.

4.2.12. Sequenzierung

4.2.12.1. M13-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Die Sequenzierung subclonierter Fragmente wurde mit Hilfe der "Didesoxy-Kettenabbruch"-Methode (29) durchgeführt. Die Didesoxyribonucleotid-Konzentrationen wurden so gewählt, daß die Kettenabbrüche im Bereich bis zu etwa 800 bp noch spezifisch waren (N. Gough, pers. Mitteilung).

4.2.12.2. "shotgun"-Sequenzierungsstrategie

Die ersten Sequenzdaten für die Clone Ch V1 und V2 ergaben sich aus der Anwendung einer "shotgun"-Sequenzierungsmethode nach Anderson (23). Im vorliegenden Fall wurden jedoch die in die Vektormoleküle einzubauenden DNA-Fragmente durch Beschallung und nachfolgende Behandlung mit Klenow-Polymerase generiert. Diese Fragmente wurden nicht wie in Referenz 23 beschrieben über Bam HI-Linker in Bam HI-Vektorspaltstellen cloniert, sondern aus Gründen der Rationalität einfach nach der Polymerase-Behandlung in die Hinc II-Vektorspaltstellen ligiert.

4.2.12.3. Sequenzierung nach Restriktionskarten

Bei dieser Sequenzierungsmethode wurde von dem fraglichen DNA-Bereich zunächst eine möglichst genaue Restriktionskarte erstellt (4.2.7.). Geeignete Subfragmente dieses Bereiches wurden nach 4.2.6. isoliert und nach 4.2.9. in geeignete M13 mp7, mp8 oder mp9 Vektormoleküle cloniert sowie nach 4.2.12.1. sequenziert.

4.2.13. Computerprogramme und Datenbank

Die Auswertung der Sequenzdaten wurde mit Programmen von R. Staden (76, 77) und P.S. Neumaier (31) durchgeführt. Die letzteren wurden angewendet um Homologien zu berechnen und die Abbildungen 6 bis 12, 14, 15 und 16 zu erstellen.

Für die Abbildungen 6 bis 12 wurde ein Programm verwendet (DNTRAN), das ausgehend von einer eingegebenen DNA-Sequenz die zugehörige Aminosäuresequenz in vorzugebenden Grenzen bestimmt (31).

Für die Abbildung 14 und die entsprechenden Homologievergleiche wurde ein Programm angewendet (DNMAHO), in dem sich bis zu 10 DNA-Sequenzen untereinander anordnen lassen. Um die größtmögliche Homologie zu erzielen, können in die Sequenzen auch Lücken eingeführt werden (31).

In Abbildung 15 sind mit Hilfe eines Computerprogrammes Aminosäuresequenzen angeordnet worden. Zu diesem Zweck wurde dasselbe Programm verwendet, das im vorhergehenden Absatz beschrieben wurde (31).

Durch ein weiteres Computerprogramm können Sequenzen paarweise verglichen werden (DNCHOD). Wenn in vorzugebenden Abschnitten Sequenzidentität vorliegt, wird dies vom Computer durch einen Punkt angezeigt. Auf einer zweiten Zeile werden auf die gleiche Art und Weise Sequenzdivergenzen symbolisiert (31).
Die Datenbank stammte von G. Hamm, EMBL, Heidelberg.

4.3. Biologische Sicherheit

Alle Experimente mit Human-DNA enthaltenden Clonen wurden entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nucleinsäuren" (4. überarbeitete Fassung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, August 1981) unter L2/B1-Bedingungen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Struktur und Evolution der V_K-Multigenfamilie des Menschen beschrieben. Die Mitglieder dieser Genfamilie codieren für die variable Region der leichten Ketten von Immunglobulin-Molekülen. Zunächst wurden in Hybridisierungsversuchen mit einer Maus V_K-Probe aus einer Phagengenbank mit menschlicher DNA neun Clone isoliert. Vier dieser Clone wurden näher charakterisiert, wobei von einem Clon verschiedene Subclone konstruiert wurden. Diese wurden in der Arbeitsgruppe benützt, um in Cosmidgenbanken, die aus menschlicher DNA konstruiert worden waren, nach weiteren V_K-Clonen zu suchen. Von den dabei gefundenen Cosmidclonen wurden sechs im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit Restriktionsnucleasen kartiert. Aus den Clonen der Phagen- und Cosmidgenbanken wurden die interessanten Abschnitte sequenziert; insgesamt wurden dabei 10 kb erfaßt. Die Sequenzdaten wurden anschließend einer Computeranalyse unterzogen.

Aufgrund der Daten der jetzigen Arbeit können folgende Schlüsse gezogen werden: Bei der Computeranalyse wurde festgestellt, daß vier der sieben analysierten V_K-Sequenzen Pseudogene sind. Daraus kann man schließen, daß ein größerer Anteil der V_K-Multigenfamilie des Menschen aus Pseudogenen besteht. Aufgrund der Restriktionskarten und der hohen Sequenzhomologie kann man annehmen, daß die Gensegmente V 2 und V 14 Allele sind. Die DNA-Sequenzvergleiche zeigen darüber hinaus, daß die Subgruppe I aus Unterfamilien von V_KI-Genen aufgebaut ist. Aus der Analyse eines der Phagenclone ergab sich, daß benachbarte V_K-Gensegmente in gleicher 5'-3'-Orientierung nebeneinander angeordnet sein können. Aus den Ergebnissen der Sequenzierung und Kartierung desselben Phagenclons und aus der Kartierung eines Cosmidclons lassen sich auch Angaben zu den Abständen von V_KI-Genen voneinander machen: Im Phagen-

clon wurde ein Abstand von 5,2 kb ermittelt; neben dem V_KI-Gen des Cosmidclons konnte innerhalb einer 20,8 kb langen Flanke kein weiteres V_KI-Gen gefunden werden.

Die vorliegenden Daten lassen auch auf einen weiteren Mechanismus der Entstehung der Antikörperdiversität in der Keimbahn schließen: Von Wu und Kabat waren ursprünglich Aminosäuresequenzen von L-Ketten verglichen worden. Dabei wurden in den variablen Bereichen die "framework" (FR) und "complementarity determining regions" (CDR) festgelegt (42). Bei weiteren Vergleichen wurden in verschiedenen L-Ketten identische FR- und CDR-Bereiche gefunden (43, 44). Davon ausgehend formulierten sie die Minigen-Hypothese, nach der ein V-Gen durch die Rekombination von Minigenen entstehen soll. Diese Hypothese wurde durch die ersten Sequenzen von V_K- und V_λ-Genen widerlegt (40, 41). In der vorliegenden Arbeit wurden alle vollständigen V_KI-Aminosäuresequenzen (2) und alle V_KI-Nucleinsäuresequenzen anderer Arbeitsgruppen (27, 28) sowie unserer Arbeitsgruppe (30, 31) verglichen. Aufgrund der Ergebnisse wird postuliert, daß die Sequenzähnlichkeiten, die zur Formulierung der Minigen-Hypothese geführt hatten, durch Genkonversions-ähnliche Mechanismen und nachfolgende Selektion entstanden sind.

6. Literaturverzeichnis

1. S. Tonegawa, Nature 302, 575-581 (1983)

2. E.A. Kabat, T.T. Wu, H. Bilowsky, M. Reid-Miller und H. Perry, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983), U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda

3. C. Milstein, Nature 216, 330-332 (1967)

4. L.E. Hood, I.L. Weissmann und W.B. Wood, Immunology (1978), Benjamin Inc., Menlo Park, Ca.

5. I. Roitt, Essential Immunology (1980), Blackwell Scientific Publications, Oxford

6. T. Honjo, Ann. Rev. Immunol. (1983), 499-528

7. H. Sakano, K. Hüppi, G. Heinrich und S. Tonegawa, Nature 280, 288-294 (1979)

8. E.E. Max, J.G. Seidman und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3450-3454 (1979)

9. C. Brack, M. Hirama, R. Lenhardt-Schuller und S. Tonegawa, Cell 15, 1-14 (1978)

10. P.W. Early, M.M. Davis, D.B. Kaback, N. Davidson und L. Hood, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 857-861 (1979)

11. H. Sakano, R. Maki, Y. Kurosawa, W. Roeder und S. Tonegawa, Nature 286, 676-683 (1980)

12. M.M. Davis, K. Calame, P.W. Early, D.C. Livant, R. Joho, J.L. Weissmann und L. Hood, Nature 283, 733-739 (1980)

13. M. Wabl und C. Steinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 6976-6978 (1982)

14. K.B. Marcu und M.D. Cooper, Nature 298, 327-328 (1982)

15. A.C. Wang, H.H. Fudenberg, J.V. Wells und D. Roelcke, Nature New Biol. 243, 126-127 (1973)

16. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell 24, 613-623 (1981)

17. M. Weigert und L. Gatmaitan, Nature 276, 785-790 (1978)

18. R.M. Lawn, E.F. Fritsch, R.C. Parker, G.B. Blake und T. Maniatis, Cell 15, 1157-1174 (1978)

19. M. Steinmetz, J. Höchtl, H. Schnell, W. Gebhard und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 8, 1721-1729 (1980)

20. M. Pech, J. Höchtl, H. Schnell und H.G. Zachau, Nature 291, 668-670 (1981)

21. J.R. de Wet, D.L. Daniels, J.L. Schroeder, B.G. Williams, K. Denniston-Thompson, D.D. Moore und F.R. Blattner, J. Virol. 33, 401-410 (1980)

22. B. Straubinger, Diplomarbeit im Fachbereich Chemie (1983)

23. S. Anderson, Nucl. Acids Res. 9, 3015-3027 (1981)

24. W. Ansorge und L. de Maeyer, J. Chromatogr. 202, 45-53 (1980)

25. H. Garoff und W. Ansorge, Anal. Biochem. 115, 450-457 (1981)

26. W. Ansorge und R. Barker, Im Druck in J. of Biochemical and Biophysical Methods

27. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Nature 288, 730-733 (1980)

28. D.L. Bentley und T.H. Rabbitts, Cell 32, 181-189 (1983)

29. F. Sanger, A.R. Coulson, B.G. Barrell, A.J.H. Smith und B.A. Roe, J. Mol. Biol. 143, 161-178 (1980)

30. H.R. Jaenichen, M. Pech, W. Lindenmaier, N. Wildgruber und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

31. M. Pech, H.R. Jaenichen, H.D. Pohlenz, P.S. Neumaier, G. Klobeck und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung

32. P.M.G.F. van Weezenbeck, T.J.M. Halsebos und J.G.G. Schoenmakers, Gene 11, 129-148 (1980)

33. J.R. Patton und Chi-Bom Chae, Anal. Biochem. 126, 231-235 (1982)

34. A.M. Frischauf, H. Garoff und H. Lehrach, Nucl. Acids Res. 8, 5541-5549 (1980)

35. G.F. Hong, J. Mol. Biol. 158, 539-548 (1982)

36. M. Poncz, D. Solowiejczy, M. Ballantine, E. Schwartz und S. Surrey, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 4298-4302 (1982)

37. R. Ollo und F. Rougeon, Nature 296, 761-763 (1982)

38. B. Breathnach und P. Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50,349-383 (1980)

39. D. Givol, R. Zakut, K. Effron, G. Rechavi, D. Ram und J.B. Cohen, Nature 292, 426-428 (1981)

40. S. Tonegawa, A.M. Maxam, R. Tizard, O. Bernhard und W. Gilbert, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1483-1485 (1978)

41. J.G. Seidman, A. Leder, M.H. Edgell, F. Polsky, S.M. Tilghman, D.C. Tiemeier und P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3881-3885 (1978)

42. T.T. Wu und E.A. Kabat, J. Exp. Med. 132, 211-250 (1970)

43. E.A. Kabat, T.T. Wu und H. Bilofsky, J. Exp. Med. 152, 72-84 (1980)

44. E.A. Kabat, T.T. Wu und H. Bilofsky, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2429-2433 (1978)

45. D. Baltimore, Cell 24, 592-594 (1981)

46. T.T. Wu und E.A. Kabat, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 5031-5032 (1982)

47. M. Brüggemann, K. Radbruch und K. Rajewsky, EMBO J. 1, 635-637 (1982)

48. R.S. Goodenow, J. Stroynawski, M. Mc Millan, N. Nicholson, K. Eakle, B.T. Sher, N. Davidson und L. Hood, Nature 302, 388-391 (1983)

49. E.H. Weiss, A. Mellor, L. Golden, K. Fahrner, E. Simpson, J. Hurst und R.A. Flavell, Nature 301, 671-674 (1983)

50. E.A. Zimmer, S.L. Martin, S.M. Beverly, Y.W. Kan und A.C. Wilson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2158-2162 (1980)

51. D.Y. Loh, A.L.M. Bothwell, M. White-Scharf,T. Imanishi- Kari und D. Baltimore Cell 33, 85-88 (1983)

52. P. Leder, D. Tiemeier und L. Enquist, Science 196, 175- 177 (1977)

53. R.E. Streeck und G. Hobom, Eur. J. Biochem. 57, 595-606 (1975)

54. F.R. Blattner, B.G. Williams, A.E. Blechl, K. Denniston-Thompson, H.E. Faber, L.A. Furlong, D.S. Grunwald, D.O. Kiefer, D.D. Moore, J.W. Schumm, E.L. Sheldon und O. Smithies, Science 196, 161-165 (1977)

55. B.G. Williams und F.R. Blattner, J. Virol. 29, 555-563 (1978)

56. T. Tanaka und B. Weisblum, J. Bacteriol. 121, 354-362 (1975)

57. J.Messing, R. Crea und P.H. Seeburg, Nucl. Acids Res. 9, 309-321 (1981)

58. B. Hohn und J. Collins, Gene 11, 291-298 (1980)

59. W. Lindenmaier, H. Hauser, J. Greiser de Wilke und G. Schütz, Nucl. Acids Res. 10, 1243-1253 (1982)

60. T. Maniatis, A. Jeffrey und D. Kleid, Proc. Natl. Acad. U.S.A. 72, 1184-1188 (1975)

61. P.W.J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes und P. Berg, J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

62. W.D. Benton und R.W. Davis, Science 196, 180-182 (1977)

63. C. Aaij und P. Borst, Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200 (1972)

64. A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)

65. U.E. Loening, Biochem. J. 113, 131-138 (1969)

66. W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Nature 258, 450-452 (1975)

67. R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 89, 267-279 (1978)

68. W. Hörz und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 73, 383-392 (1977)

69. E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

70. M. Steinmetz, H.G. Zachau und B. Mach, Nucl. Acids Res. 6, 3213-3229 (1979)

71. A. Dugaiczyk, H.W. Boyer und H.M. Goodman, J. Mol. Biol. 96, 171-184 (1975)

72. M. Dagert und S.D. Ehrlich, Gene 6, 23-28 (1979)

73. H.C. Birnboim und J. Doly, Nucl. Acids Res. 7,1513-1523 (1979)

74. D. Ish-Horowicz und J.F. Burke, Nucl. Acids Res. 9, 2989-2998 (1981)

75. F. Sanger, S. Nicklen und A.R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467 (1977)

76. R. Staden, Nucl. Acids Res. 5, 1013-1015 (1978)

77. R. Staden, Nucl. Acids Res. 8, 3673-3694 (1980)

78. H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81, 419-423 (1973)

79. "Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents", Eur. J. Biochem. 15, 203-208 (1970)

80. "Abbreviations and Symbols", Eur. J. Biochem. 74, 1-6 (1977)

7. Abkürzungsverzeichnis

bp Basenpaare

C konstante Region von leichten und schweren Ketten

CDR "complementarity determining region": variable Region der leichten und schweren Ketten, die bei der Antigen-Antikörper Erkennung mit dem Antigen in Wechselwirkung tritt.

Ch 1ff: Clone aus einer Genbank mit dem Lambda-Phagen Charon 4A als Vektor (18)

cos 10-49: Clone aus einer Genbank mit dem Vektor pHC 79-2 cos (30, 59)

cos 50-99: Clone aus einer Genbank mit dem Vektor pHC 79/2 cos/tk (30, 59)

D "diversity"-Segment: Gensegment, das die Diversität der variablen Regionen schwerer Ketten erhöht.

EDTA Ethylendiamintetraacetat (Natriumsalz)

FR "framework region": Region, die die konstanter Bereiche der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten bestimmt.

H-Kette schwere Kette der Antikörper

J "joining"-Segment: Gensegment, an das die V-Gensegmente der leichten Ketten umgelagert werden

kb 1000 Basenpaare ("Kilobase")

L-Kette leichte Kette der Antikörper

OD optische Dichte

PEG Polyethylenglycol

SDS Natriumdodecylsulfat

SSC Standard-Saline-Citrat (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH=7,0)

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

V variable Region der leichten und schweren Ketten

V_K-Gensegmente, die in den rekombinanten Clonen enthalten sind, werden durch Zahlen und Buchstaben gekennzeichnet, z.B. ist V4B das zweite V-Gen auf dem Clon Ch 4.
DNA-Fragmente und Subclone werden durch Zahlen gekennzeichnet, z.B. ist 1-2 ein Subclon von Ch 1.

Die Bezeichnungen der Restriktionsnucleasen entsprechen den in Referenz 78 angegebenen Empfehlungen. Die anderen Angaben entsprechen den Empfehlungen der "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature", die in den Referenzen 79 und 80 beschrieben sind.

Lebenslauf:

Name: Jaenichen
Vorname: Hans-Rainer
Geburtsdatum: 23. Juni 1955
Geburtsort: Seelow, Kreis Lebus, Mark Brandenburg
Name des Vaters: Jaenichen, Horst;
geboren am 3. August 1924,
Beruf: Friseurmeister, i. R.
Name der Mutter: Jaenichen, Gisela,
geborene Schwanz; geboren am 5. Juni 1927,
verstorben am 28. März 1977
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch
Schulbildung: Grundschule in Stuttgart-Heumaden 1962-1966
Wagenburg-Gymnasium in Stuttgart 1966-1974
Abitur 1974
Wehrdienst: Oktober 1974 bis März 1975
Zivildienst: März 1975 bis Januar 1976
Hochschulstudium: Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart-70
Studiengang Biologie
Beginn Wintersemester 1975/76
Vordiplomausbildung:

Physik	(Prof. Rentschler)
Anorg. Chemie	(Prof. Hahn)
Org. Chemie	(Prof. Kraus)
Botanik	(Prof. Frenzel)
Pflanzenphys.	(Prof. Heß)
Zoologie	(Prof. Rahmann)

Diplomvorprüfung: 1977, Note: sehr gut
Diplomausbildung:

Mikrobiologie	(Prof. Lingens)
Genetik	(Prof. Mechelke)

Biochemie (Prof. Siebert,
Prof. Koch,
Prof. Pfaender)
Zellbiologie und Virologie:
(Prof. Bayreuther)

Diplomhauptprüfung: 1980, Note: mit Auszeichnung

Diplomarbeit: 1980, Note: sehr gut, Arbeitsgruppe Zellbiologie und Virologie, Prof. Bayreuther

Dissertation: seit Januar 1981, Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians Universität, Prof. Zachau

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

München, den 1. Januar 1984